Baseline N2000
Sistema de Aquisição de Dados

Manual do Usuário
Segunda Edição

Índice

Capítulo 1 – Introdução

Capítulo 2 – Instalação

Capítulo 3 – Conceitos Básicos

Capítulo 4 – Operações com Arquivos

Capítulo 5 – Aquisição de Dados em Tempo Real – Estação de Trabalho OnLine

Capítulo 6 – Iniciando

Capítulo 7 – Procedimentos de Operação Para Análises Quantitativas

Capítulo 8 – Gerenciamento de Um Arquivo de Método

Capítulo 9 – Processamento de Dados Pós-Aquisição – Estação de Trabalho OffLine

Capítulo 1 – Introdução:

O Sistema de Aquisição de Dados Baseline N2000 é uma estação de trabalho de duplo canal que é projetada para prover ao usuário capacidades de coleta, apresentação e análise de sinais de quaisquer detetores comercialmente disponíveis em GC. HPLC ou CE. O sistema compreende uma unidade externa autônoma de conversão Analógico / Digital (A/D) e o pacote de software correspondente.
Da mesma forma que você pode conectar o Sistema de Dados Cromatográficos (CDS) a dois detetores do mesmo instrumento para aquisição de dados simultâneos, você também pode conectar a dois instrumentos diferentes para aquisição independente de dados. Uma vez que o sistema esteja instalado, seu PC torna-se um sofisticado integrador cromatográfico e um poderoso armazenador de dados e instrumento de análise.

O sistema lhe permite:

- Programar, modificar, catalogar, chamar e imprimir métodos de processamento de dados;
- Catalogar e chamar dados cromatográficos;
- Analisar dados por integração para encontrar, identificar e traçar gráficos de picos;
- Programar e correr lotes de análises automatizadas;
- Manusear graficamente as apresentações, através de capacidades de mais zoom / menos zoom, fatiar / não fatiar a tela, rolar, posição relativa dos cursores, traçar tempos e amplitudes, e apresentação da linha de base;
- Especificar graficamente eventos no tempo;
- Calcular, apresentar e imprimir relatórios em vários formatos, nominalmente, a Área, Normalização, Padrão Externo e Padrão Interno;
- Criar Relatórios personalizados;
- Exportar dados armazenados através de outros formatos de dados de tal forma que possam ser utilizados em outros pacotes de softwares como Excell, Lotus 123, e dBase III/IV;
- Dinamicamente ligado a outras aplicações do Windows, tais como Microsoft Excell e Microsoft Word para troca de dados.

1.1 Especificações da Estação de Trabalho N2000

Gerais:

- Número de Canais 2
- Voltagem de Alimentação: -5 mV a cerca de 1,7 V
- Resistência de Entrada: > 10MΩ
- Sensibilidade de Integração: 1 µV-seg
- Range Dinâmico: 10^7
- Linearidade: ± 0,1%

Processamento de Picos:

- Número de Picos: > 1000
- Largura de Picos: 0,1 seg
- Programação Automática de Tempo
- Integração Manual Habilitada
- Identificação Automática de Picos Complexos e partição precisa de picos sobrepostos
- Traçado e correção automáticos da linha de base
- Elimina automaticamente o efeito de picos negativos
- Vai de encontro às normas de GMP

Métodos de Identificação de Picos:

- Método de Tempo Conservativo
- Método de Tabela de Componentes

Parâmetros de Integração:

- Área de Pico
- Altura de Pico

Métodos de Cálculo Quantitativo:

- Método de Normalização
- Método de Normalização por Calibradores
- Método de Padrão Interno
- Método de Múltiplos Padrões Internos
- Método de Padrão Externo
- Método de Índice de Retenção

1.2 Requisitos do Sistema

Hardware (PC)

- PC IBM ou 100 % compatível com processados Pentium 1 ou superior
- CPU: 166 MHz ou mais rápido
- Memória: 32 Mb ou mais
- Disk Drives: 01 Hard Disk, 01 CD-ROM,
- Monitor: SVGA, 256 cores, com uma resolução de 1024 x 768 pixels
- Mouse: USB ou serial
- Impressora: Qualquer impressora compatível com ambiente Windows

Software:

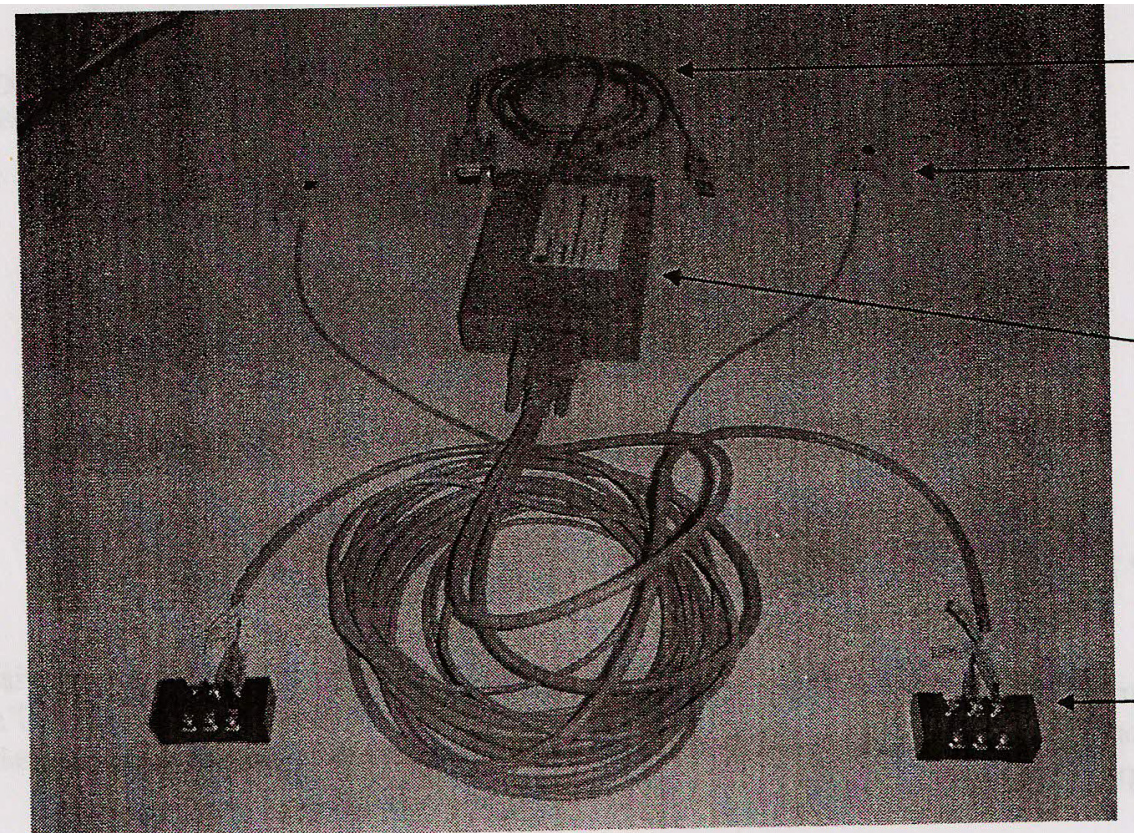
- Sistema Operacional Windows 98 ou superior
- Internet Explorer 4.0 ou superior

Capítulo 2 – Embalagem e Instalação

2.1 Embalagem

Um kit completo do Sistema de Dados Cromatográficos BaseLine consiste em:

1. 01 Unidade: interface de conversão A/D de dois canais;
2. 01 Unidade: Estação de Trabalho Cromatográfica, em CD;
3. 01 Unidade: Cabo de Comunicação e Alimentação USB;
4. 01 Unidade: conjunto de duplo cabo de sinal com os respectivos disparadores remotos;
5. 02 Unidades: Terminais de Junção;
6. 01 Unidade: Manual do Usuário.



2.2 Instalação

Antes de Iniciar:

1. Desembale todos os materiais essenciais e verifique que todos os itens estejam presentes (conforme a relação do item 2.1).
2. Os cabos de sinal são para que você possa efetuar a conexão dos dois canais do Sistema de Dados Cromatográficos a dois detetores do mesmo instrumento ou conectar cada cabo ao detetor de um instrumento diferente. É claro que você pode utilizar, também, apenas um cabo para um único detetor e deixar o outro desconectado.

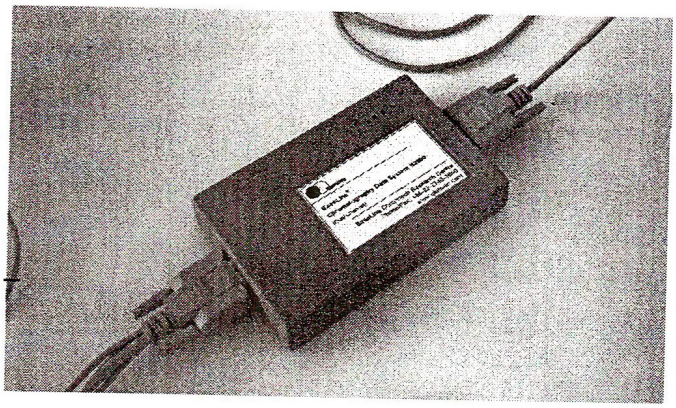
Primeiro Passo: Conectar o Cabo Analógico de Sinal

2.2.1.1. Descasque cerca de 6 a 7 mm da ponta do cabo de sinal "+" e do cabo de sinal "-" do cabo de saída de sinal do seu detetor;

2.2.1.2. Insira os cabos sinal "+" e sinal "-" no terminal de junção e fixe com aperto do parafuso de fixação utilizando uma chave de fenda;

2.2.1.3. Repita o procedimento com o cabo de sinal da interface A/D, certificando-se de que o fio vermelho esteja conectado no borne correspondente ao cabo sinal "+" da saída do detetor e o azul ou branco ao cabo sinal "-" da saída do detetor;

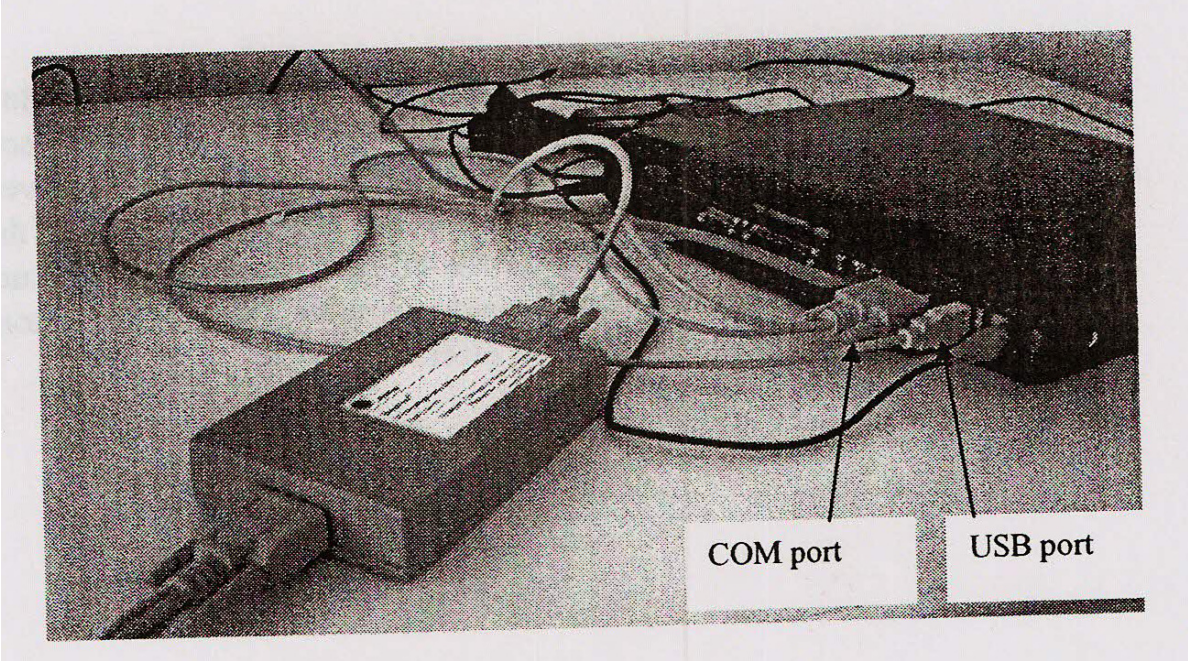
2.2.1.4. Plugue o cabo de sinal A/D na porta serial da interface marcada como "Signal Input".



Segundo Passo: Conectando a Interface A/D ao Seu Computador

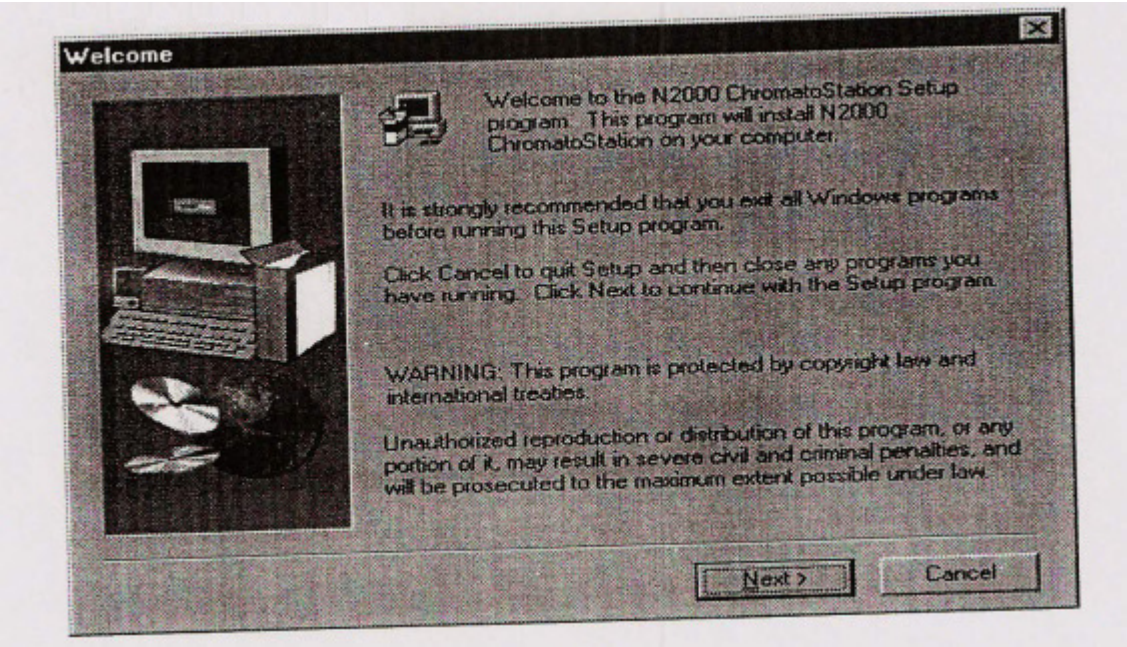
A interface A/D está equipada com uma porta serial RS-232. Um cabo serial do tipo DB-9 conecta a interface A/D ao seu PC, através da porta COM. Esta interface simples permite à interface A/D operar em um computador desktop ou notebook.

2.2.2.1. Fixe uma extremidade do cabo identificado com COM&USB na entrada serial de seu computador (painel traseiro da CPU);
2.2.2.2. Fixe a outra extremidade do cabo na porta COM da interface A/D;
2.2.2.3. Agora, conecte a extremidade livre (conector USB) do cabo, na porta USB de seu computador (painel traseiro da CPU). Todos os três leds na interface A/D irão acender quando seu computador for ligado.



Terceiro Passo: Instalando a Estação de Trabalho N2000

2.2.3.1. Ligue seu computador;
2.2.3.2. Aguarde a inicialização de seu sistema operacional Windows;
2.2.3.3. Localize sua cópia da Estação de Trabalho N2000. Insira o CD no drive de CD-ROM;
2.2.3.4. Caso o Autorun não inicialize o CD, localize o arquivo “setup.exe” no diretório do CD;
2.2.3.5. Ativar o “setup.exe” com duplo clique do mouse para inicializar o Install Wizard como mostrado abaixo;
2.2.3.6. Siga as instruções do Setup Wizard;
2.2.3.7. Se você seguir as recomendações do Setup Wizard como padrão, uma pasta do programa será criada , como esta:
C:\Program Files\N2000 Chromatostation\


Welcome
Welcome to the N2000 ChromatoStation Setup program. This program will install N2000 ChromatoStation on your computer.
It is strongly recommended that you exit all Windows programs before running this Setup program.
Click Cancel to quit Setup and then close any programs you have running. Click Next to continue with the Setup program.
WARNING: This program is protected by copyright law and international treaties.
Unauthorized reproduction or distribution of this program, or any portion of it, may result in severe civil and criminal penalties, and will be prosecuted to the maximum extent possible under law.
Next >
Cancel

Quarto Passo: Conectar o Disparador Remoto para Receber o Sinal de Inicio de Corrida do Instrumento (Opcional)

O Disparador Remoto é fornecido como uma alternativa para executar o comando para iniciar a aquisição de dados. Simplesmente acione uma vez o botão do Disparador Remoto após a injeção da amostra para ativar o Sistema de Dados Cromatográficos para iniciar a aquisição de sinais de dados enquanto a Estação de Trabalho OnLine estiver ativa. De qualquer forma, o disparador remoto pode ser utilizado, também, para receber o sinal de inicio de corrida a partir do instrumento. Corte o fio por fora da caixa do botão do disparador remoto para expor os dois fios. Conecte as duas extremidades do fio ao botão de inicio de corrida do instrumento ou ao botão de inicio de corrida do injetor automático. Isto irá automatizar o comando de inicio de corrida para disparar toda vez que uma injeção for efetuada.

Capítulo 3 – Conceitos Básicos

3.1. Termos de Referência

3.1.1. Conceitos Básicos No Cromatograma

a. Cromatograma: Uma apresentação gráfica da resposta dos sinais gerados por compostos quando eles são eluídos de uma coluna cromatográfica e detectados por um detetor em função de tempo ou volume do gás de arraste ou líquido;
b. Pico Cromatográfico: Um pico em um cromatograma que corresponde a um composto eluído de uma coluna;
c. Linha de Base: Uma linha reta que conecta o ponto inicial e o ponto final de um pico;
d. Altura de Pico: A distância entre o ponto mais alto do pico e a linha de base;
e. Largura de Pico: A distância entre as duas linhas tangenciais estendidas de um pico, cortando a linha de base;
f. Largura do Pico Em Sua Meia Altura: A distância entre o ponto central de uma linha reta traçada paralelamente à linha de base na metade da altura do pico em ambos os lados do pico;
g. Área do Pico: A área do triângulo formado pelo pico e a linha de base.

3.1.2. Parâmetros de Processamento de Picos

Todas as operações envolvendo a detecção de um pico, correção do desvio de uma linha de base, determinação dos pontos de início e final de pico, divisão de picos não completamente separados e medição das áreas dos picos são efetuados pelos parâmetros de processamento de picos, os quais são mostrados na tabela abaixo:

Parâmetro	Unidade e Range	Efeito
Largura de Pico (Peak Width)	0 – 50 (5) s	Utilizado para eliminar picos cujos valores de largura de pico sejam inferiores aos programados neste parâmetro. Este valor é baseado na largura de pico a meia-altura do menor pico efetivo. O valor pode ser estimado a partir do pico cromatográfico correspondente.
Slope (inclinação)	0 – 99999,99 (70) (V*s)	Reflete a sensibilidade de detecção dos picos. Este parâmetro é utilizado para determinar os pontos de início e o final de um pico.
Área Mínima de Pico (Minimum Peak Área)	0 – 99999,99 (0) (V*s)	Utilizado para apagar picos com áreas de pico inferiores àquelas programadas para este parâmetro e, desta forma, remover os picos irrelevantes, tais como ruídos instrumentais.
Drift (tendência)	0 – 99999,99 (0) (V*s)	Utilizado para determinar a extensão de uma mudança na linha de base assim como para realizar a medição da área de pico em um modo automático. Programar “0” para correção automática.
Parâmetro de Variação de Tempo (Time Variation Parâmeter)	0 – 2000 (0) min	De acordo com a regra geral para variação de contornos de picos, a inclinação é reduzida pela metade e a largura do pico é duplicada quando o tempo pré-estabelecido é atingido. Programar “0” para mudanças automáticas de acordo com a relação entre a largura de pico e o contorno real do pico. Programar um valor maior do que o final de corrida quando a função padrão não é desejada.
Locking Time (Tempo de “Travamento”)	0 – 99999,99 (0) min	Utilizado para apagar todos os picos que aparecem entre o início de corrida e o tempo de travamento. Primariamente, utilizado para remover picos irrelevantes que aparecem imediatamente após a injeção, tais como picos de ar e picos negativos.
Peso da Amostra (Sample Weight)	0 – 99999,99 (100)	O peso da amostra a ser analisada. Não pode ser estabelecido em “0”. Efetivo para métodos de não-normalização.

Nota: Os valores entre parêntesis são valores padrão utilizados na Estação de Trabalho.

3.2. Conceitos Relevantes À Estação de Trabalho N2000

a. Aquisição de Dados – Uma unidade de aquisição de dados é utilizada para coletar os sinais gerados de um detetor e converte os sinais simulativos em digitais. Os sinais digitais são, então, transferidos para a Estação de Trabalho N2000 e armazenados em arquivos de dados.

b. Integração – Integração é utilizada para determinar o pico e seu tamanho a partir do sinal gráfico, o qual é indispensável para análise quantitativa. Na Estação de Trabalho N2000, a integração é desempenhada inicialmente identificando os pontos de início e final do pico e marcando-os com "|" e, ao mesmo tempo, buscando pelos pontos superiores destes picos para determinar seus tempos de retenção, estabelecer linhas de base, áreas de pico, alturas de pico e larguras de pico. Estes processos são controlados pela Tabela de Parâmetros de Integração, pela Tabela de Tempos e pela Tabela de Eventos de Integração Manual.

c. Quantificação – Determinação de concentrações de compostos presentes na amostra, baseados na área dos picos ou na altura dos picos, geralmente envolve os seguintes processos: análise de uma solução padrão com concentrações conhecidas para obter o fator de resposta; análise de uma solução da amostra com concentrações desconhecidas, comparação dos fatores de resposta com os do padrão e determinação da concentração da amostra utilizando o fator de calibração obtido com o padrão.

d. Calibração –

   A Calibração é utilizada para determinar o fator de resposta para um componente pela injeção e análise de uma solução padrão com concentrações conhecidas;

   Número de Repetições – é o número de injeções paralelas com a mesma solução padrão;

   Pontos de Calibração – Consistem nos pontos de calibração obtidos por calibração com soluções padrão de várias concentrações;

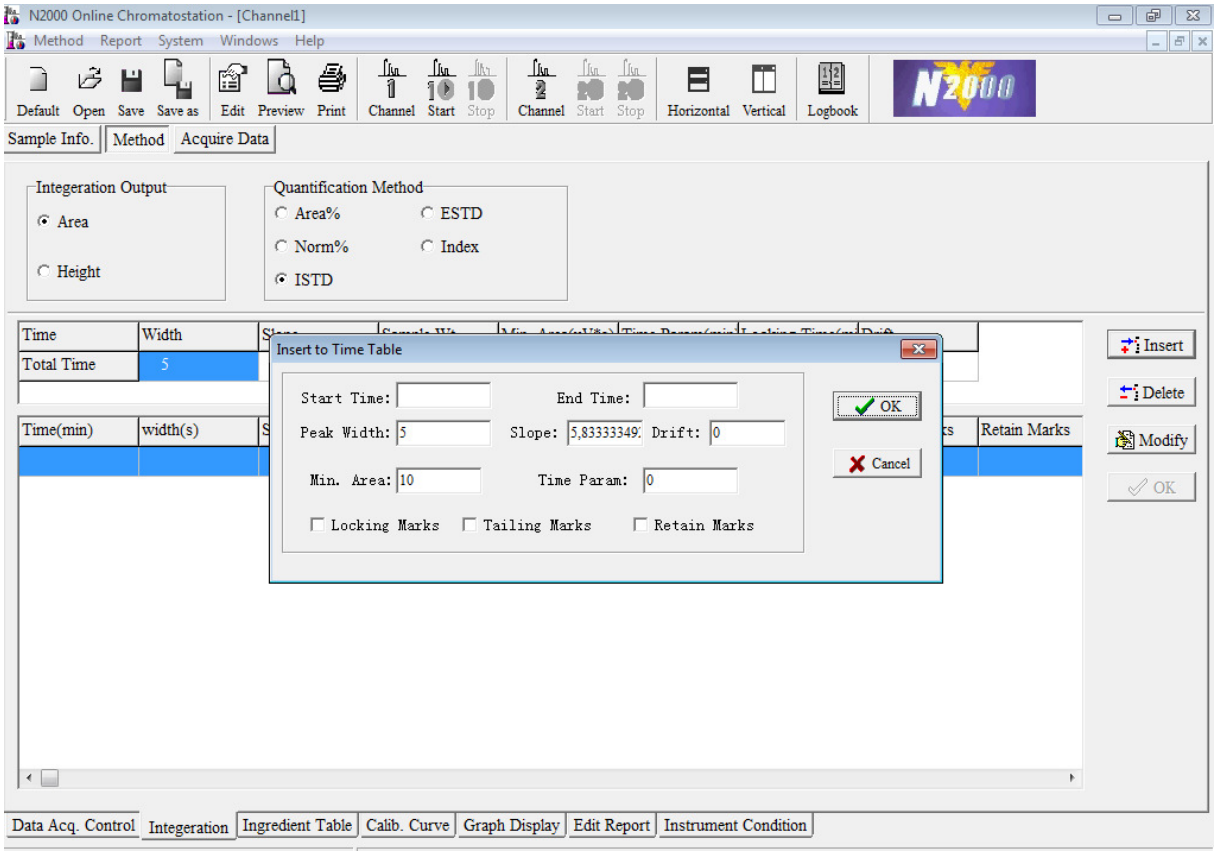
   Padrão – Também chamado de Solução Padrão ou Mistura Padrão;

   Curva de Calibração – Um gráfico representando o sinal de resposta para um composto como função da concentração.

e. Relatório – O relatório contém as informações qualitativas e quantitativas sobre a amostra processada. O relatório pode ser diretamente impresso ou apresentado na tela do computador.

3.3. Conceitos Específicos Utilizados na Estação de Trabalho N2000

a. **Arquivo de Método (Method File - .mtd)** – Método é um programa que é utilizado para controlar a aquisição de dados, apresentação, armazenamento, cálculos, impressão e, ao mesmo tempo, gravar as condições experimentais. O método inclui Controle de Aquisição de Dados, Parâmetros de Integração, Tabela de Ingredientes, Controle de Apresentação do Gráfico, Edição de Relatórios, Condições do Instrumento, etc.
   O método utilizado nesta estação de trabalho pode ser classificado em três catálogos: Guardar Método, Método Padrão, Método Atual, cujos arquivos possuem a extensão .mtd.
b. **Tabela de Ingredientes (ou seja, Tabela de ID)** – A Tabela de Ingredientes é utilizada para identificar picos para utilização com cálculos de não-normalização.
c. **Arquivo de Dados de Cromatograma (Chromatogram Data File) (.dat)** – É o arquivo que contém apenas a informação digital sobre os picos cromatográficos. São arquivados com a extensão .dat.
d. **Arquivo Original (Original File) (.org)** – O arquivo original de processamento de dados contém informação, não apenas do cromatograma, mas das condições experimentais, método de análise, e resultados analíticos também. Este é um arquivo binário, somente para leitura, e não pode ser modificado.
e. **Arquivo Modificado (Modified File) (.mdy)** – O arquivo é salvo após serem feitas modificações a partir do arquivo original (.org) e recebe a extensão .mdy.
f. **Diário (LogBook)** – Todas as operações com o método, aquisição de dados, etc., são automaticamente gravadas no Diário.
g. **Tabela de Eventos de Integração Manual** – Uma coletânea de eventos de integração manual.
h. **Tabela de Sequência de Tempo** – Para mover picos irrelevantes de um cromatograma durante a análise, você pode ativar a função “Locking”. Isto poderá ser feito seguindo-se os passos abaixo:
   Vá até Integração e clique no botão insert para abrir a janela “Tabela de Sequência de Tempo”.



Tecle os valores apropriados nos quadros Start Time e End Time. O Start Time não pode ser igual a "0". O start time, no próximo evento de tempo não pode se sobrepor com o End Time da janela anterior.

Marque a caixa "Locking Marks" para remover todos os picos que caiam na faixa de tempo definida na tabela de sequencia de tempo.

Marque a caixa "Tailing Marks" para tratar como picos caudados todos os picos que caiam na faixa de tempo definida na tabela de sequencia de tempo.

Marque a caixa "Retain Marks", para manter a mesma linha de base para integração de todos os picos dentro da faixa de tempo definida na tabela de sequencia de tempo.

Capítulo 4 – Operações com Arquivos

4.1. Métodos Gerais Para Operações com Arquivos

Carregar um Método (Load) – Carrega um método salvo no hard-disk para ser utilizado como método atual para o processamento dos dados.

Salvar um Método (Save) – Salva um método atualmente em uso com o mesmo nome com que foi carregado do HD para evitar que o método seja perdido devido a eventos inesperados.

Salvar Método Como (Save As) – Salva o método correntemente em uso no HD com um nome diferente daquele com o qual foi carregado.

Método Padrão (Default) – Utiliza o método armazenado na estação de trabalho como método corrente.

Abrir um Cromatograma (Open) – Resgata um cromatograma do HD para processamento. O cromatograma pode ser visualizado, ou ampliado na tela antes de ser carregado no desktop.

Salvar um Cromatograma (Save) – Salva o cromatograma atualmente exposto na tela com um nome diferente no HD. Necessita selecionar ou digitar um nome com a extensão .mdy.

4.2. Métodos Gerais Para Manuseio de Cromatogramas

Ampliar Um Cromatograma – posicione o cursor no segmento de cromatograma que será ampliado. Segure o botão esquerdo do mouse e desenhe uma área do canto superior esquerdo da seção para o canto inferior direito da mesma. A área selecionada será ampliada para preencher a tela assim que o botão do mouse for solto.

Retornar ao Cromatograma Original – A operação é exatamente oposta à da ampliação descrita acima. Posicione o cursor em qualquer ponto do cromatograma e desenhe uma área do canto inferior direito para o canto superior esquerdo, segurando o botão esquerdo do mouse. O cromatograma original, como era antes da ampliação, será apresentado na tela, assim que o botão do mouse for solto.

Arrastar um Cromatograma – Posicione o cursor no segmento do cromatograma e mova o mouse na direção do segmento a ser visualizado, enquanto mantém o botão direito do mouse pressionado. O segmento será visualizado assim que o botão do mouse for solto.

Selecionar um Pico De Um Cromatograma – Segurar a tecla SHIFT e posicionar o cursor no pico de interesse, clicando com o botão esquerdo do mouse. O pico selecionado será marcado com uma moldura amarela. Quando editando uma tabela de ingredientes, clique em “Insert” para mostrar o tempo de retenção correspondente.

Selecionar uma Faixa de Tempo – Segurar a tecla SHIFT, arraste o mouse para desenhar uma área externa a uma faixa de tempo desejada. Isto é útil durante a edição da Tabela de Sequencia de Tempo.

Apresentar um Cromatograma em Escala Total – (Full Scale) – Apresenta todos os picos em uma janela com o pico mais alto como máximo do eixo Y. Este é o modo padrão utilizado nesta estação de trabalho.

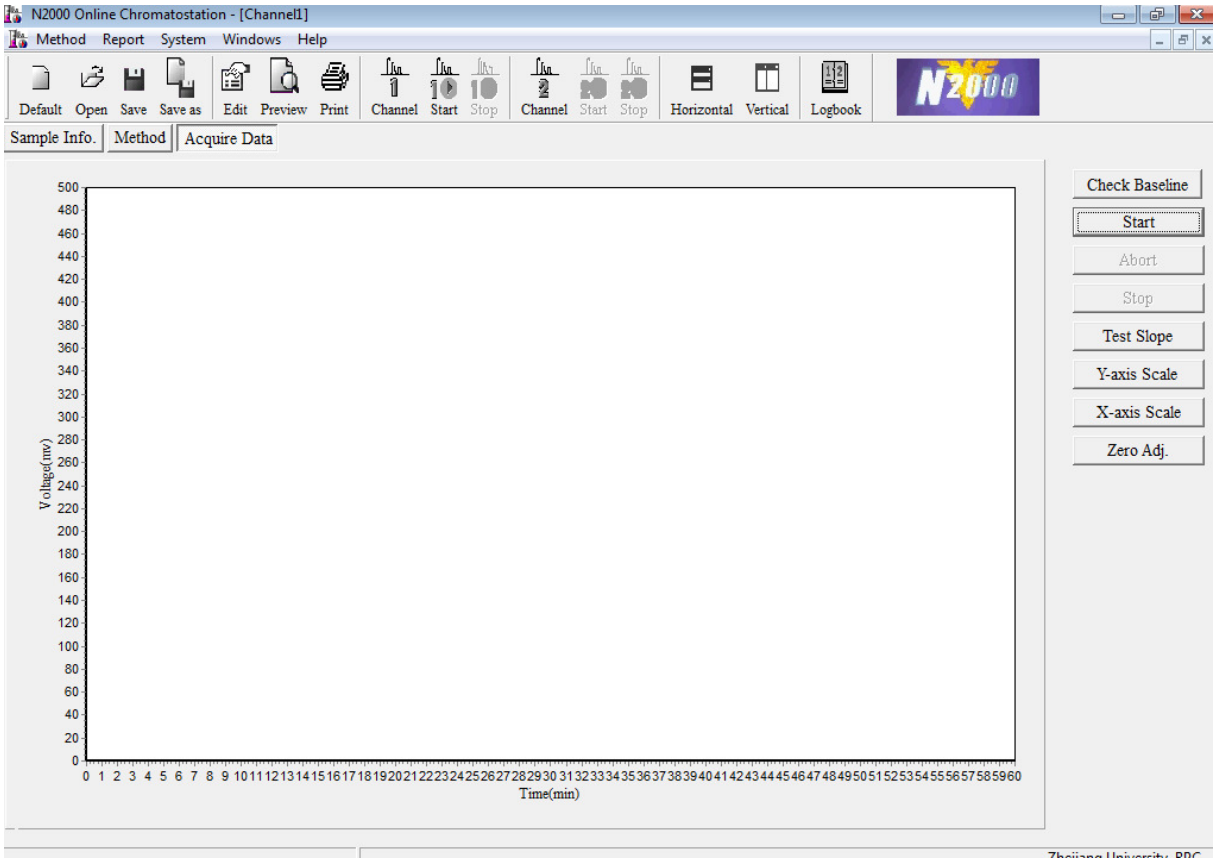
Apresentar um Cromatograma em Autoescala – (Autoscale) – Seleciona uma escala para a estação de trabalho para apresentar um cromatograma com um efeito ótimo.

Apresentar um Cromatograma com uma Escala Fixa – (Fixed Scale) – Apresenta um cromatograma com uma definição por voltagem ou por faixas de tempo.

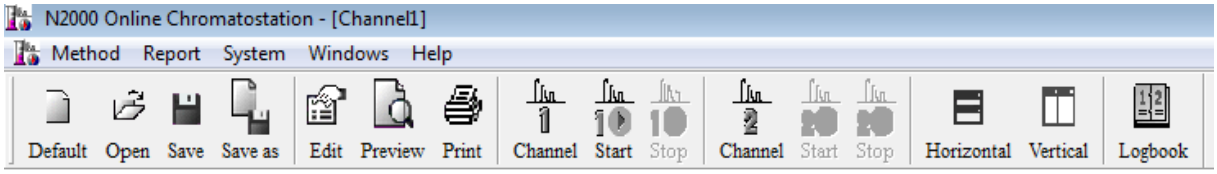
Capítulo 5 – Aquisição de Dados em Tempo Real – A Estação de Trabalho OnLine

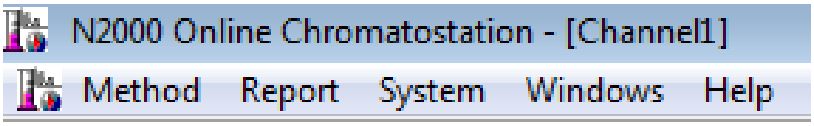
5.1. Interface Para Aquisição em Tempo Real

A Estação de Trabalho Cromatográfica N2000 OnLine consiste em: Menu Principal (Main Menu), Barra de Ferramentas (Tool Bar) e Caixa de Diálogo PopUp, como mostrado abaixo. A estação de trabalho com duplo canal pode ser utilizada para aquisição de dados de dois detetores separadamente.



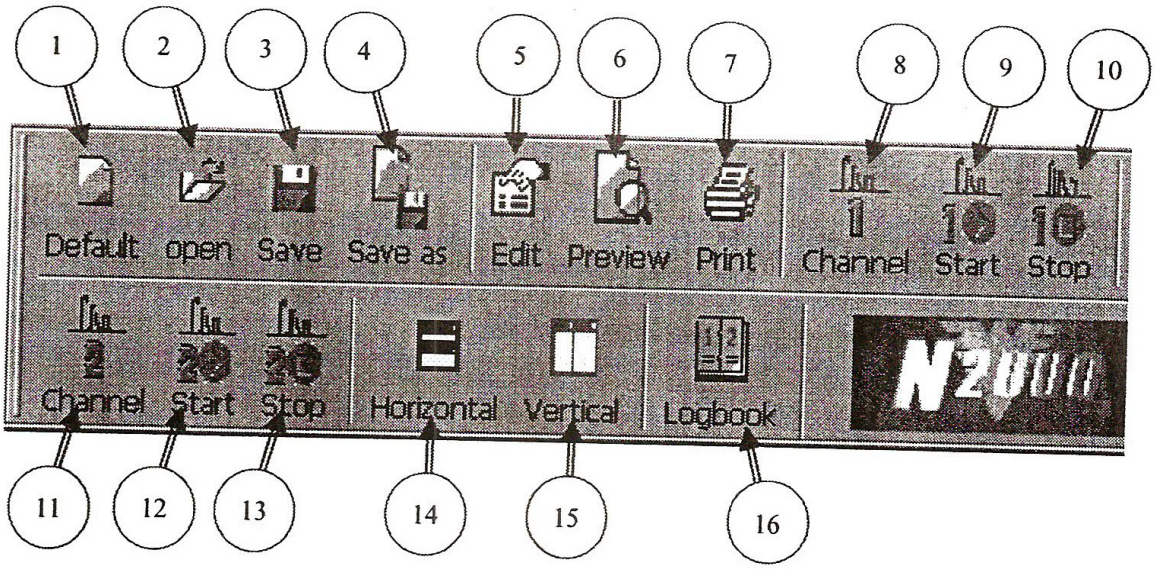
5.2. Menu Principal


N2000 Online Chromatostation - [Channel1]
Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook



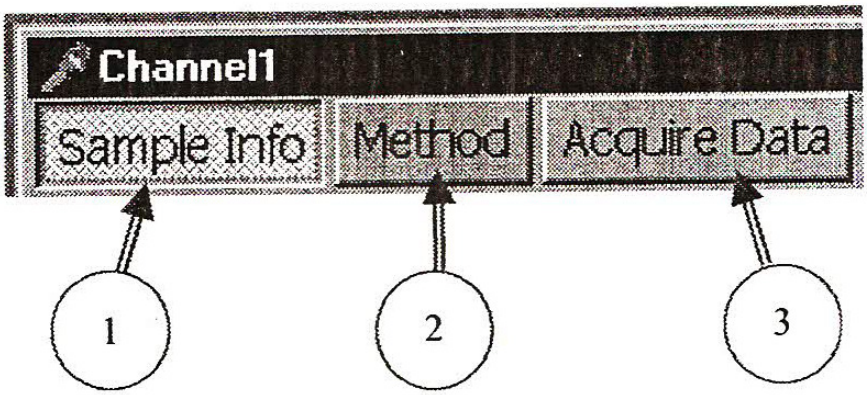
1. “Method”, para selecionar o método de operação para adquirir os dados de sua amostra;
2. “Report”, para edição e modificação de seu relatório do experimento;
3. “System”, para programar a frequência da aquisição dos dados e outros;
4. “Windows”, para abertura e regulagem do canal de amostragem; e
5. “Help”, para explicação do pacote de software.

5.3. Barra de Ferramentas



1. “Default” – para utilizar método padrão;
2. “Open” – para abrir métodos de operação já existentes;
3. “Save” – para salvar métodos de operação modificados;
4. “Save As” – para salvar métodos de operação recém-criados;
5. “Edit” – Para editar seu relatório de experimento;
6. “Preview” – para visualizar seu relatório de experimento após compilação ou modificação;
7. “Print” – para imprimir seu relatório;
8. “Channel 1” – para abrir o canal 1;
9. “Start” – para iniciar a aquisição de dados através do canal 1;
10. “Stop” – para encerrar a aquisição de dados através do canal 1;
11. “Channel 2” - para abrir o canal 2;
12. “Start” – para iniciar a aquisição de dados através do canal 2;
13. “Stop” – para encerrar a aquisição de dados através do canal 2;
14. “Horizontal” – Para acomodar horizontalmente as duas caixas de diálogo (canal 1 e 2);
15. “Vertical” - Para acomodar verticalmente as duas caixas de diálogo (canal 1 e 2);
16. “logbook” – Para arquivar os experimentos que forem feitos.

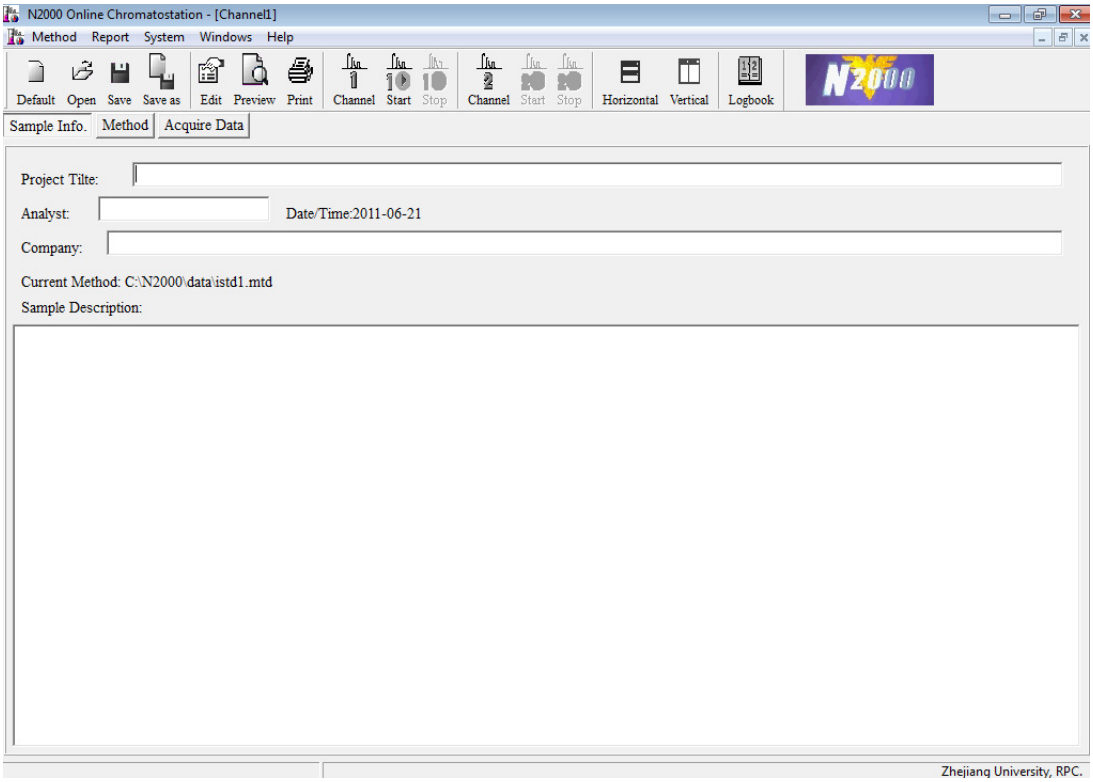
5.4. Caixas de Diálogo



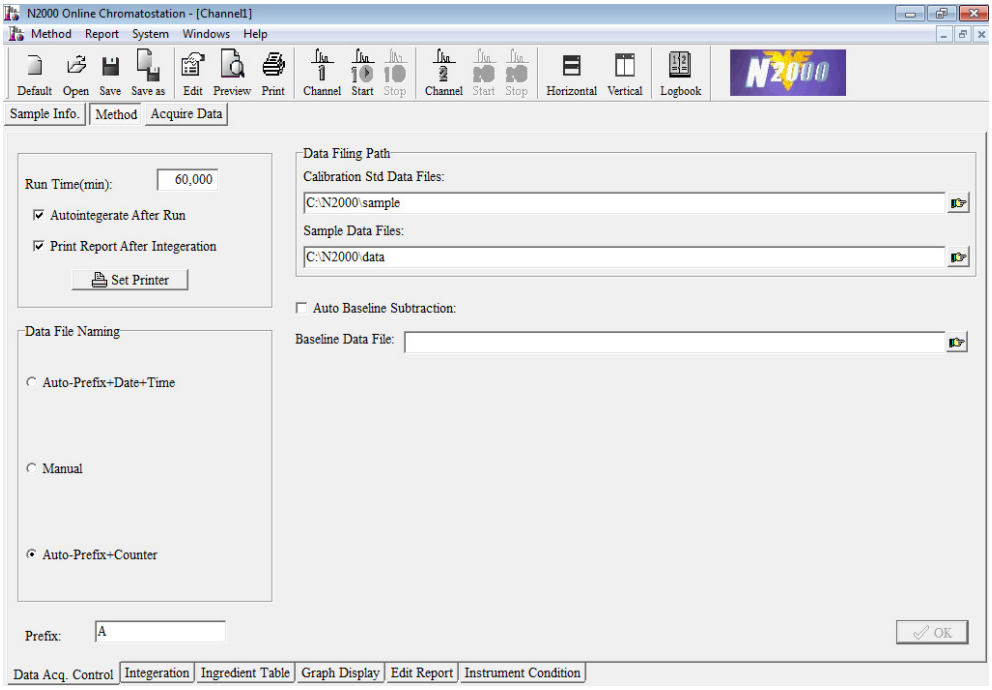
1. “Sample Info” – para colocação das informações sobre a amostra;
2. “Method” – para selecionar o método com o qual será realizado o experimento;
3. “Acquire Data” – Para a aquisição dos dados.

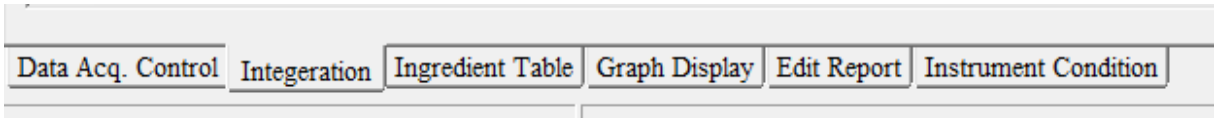
5.5. Janela do Canal de Aquisição de Dados

Informe os Dados da Amostra


N2000 Online Chromatostation - [Channel1]
Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
Sample Info. Method Acquire Data
Project Tilte:
Analyst:
Date/Time:2011-06-21
Company:
Current Method: C:\N2000\data\istd1.mtd
Sample Description:
Zhejiang University, RPC.

Prepare um Método

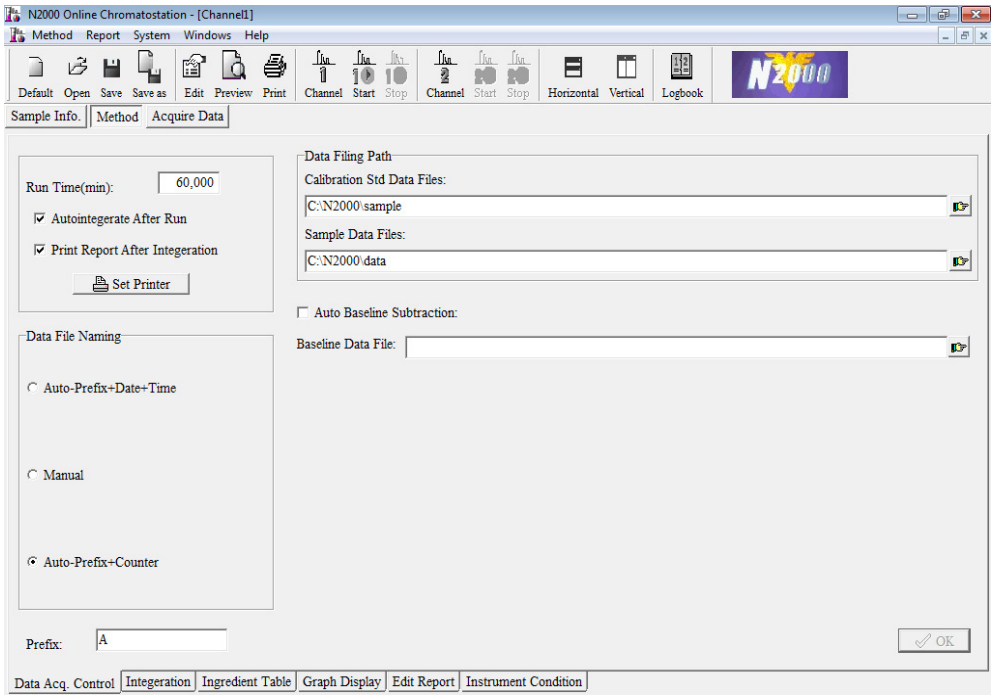




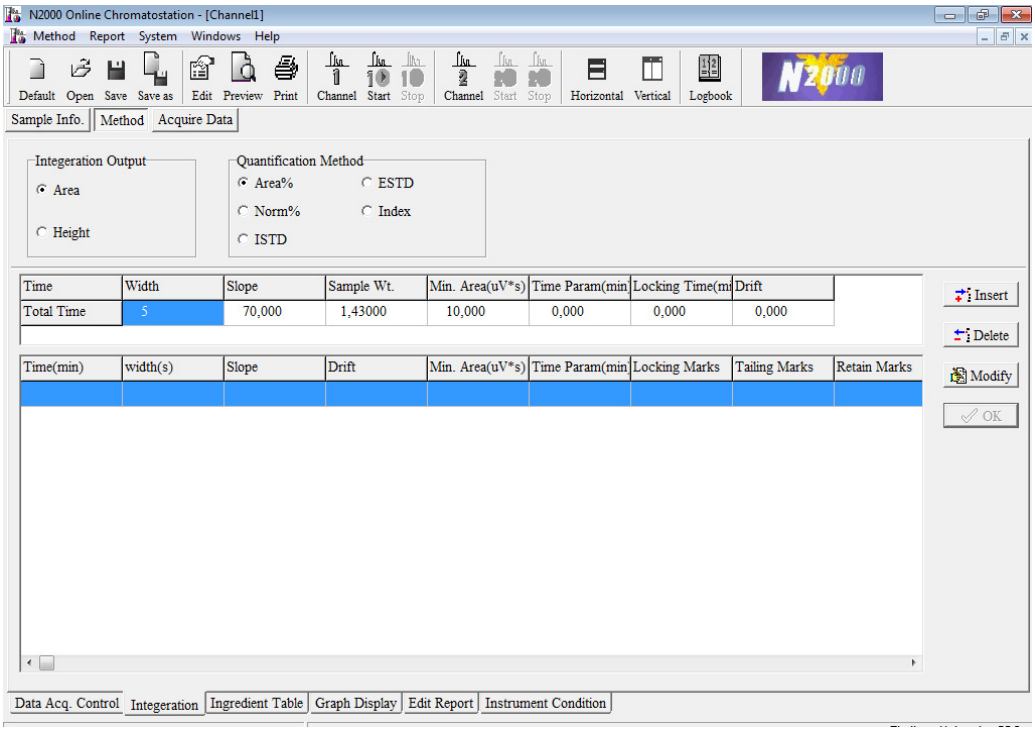
As seguintes opções estão disponíveis:

1. “Data Acq Control” – para controlar o processo de aquisição de dados;
2. “Integration” – para informar os parâmetros, variáveis e métodos de integração;
3. “Calibration Table” ou “Ingredient Table” – para editar a tabela de calibração ou criar uma tabela de componentes;
4. “Graph Display” – Para definir os parâmetros de apresentação do gráfico no relatório;
5. “Edit Report” – para determinar o conteúdo de seu relatório;
6. “Instrument Condition” – Para introdução das características de operação de seu equipamento.

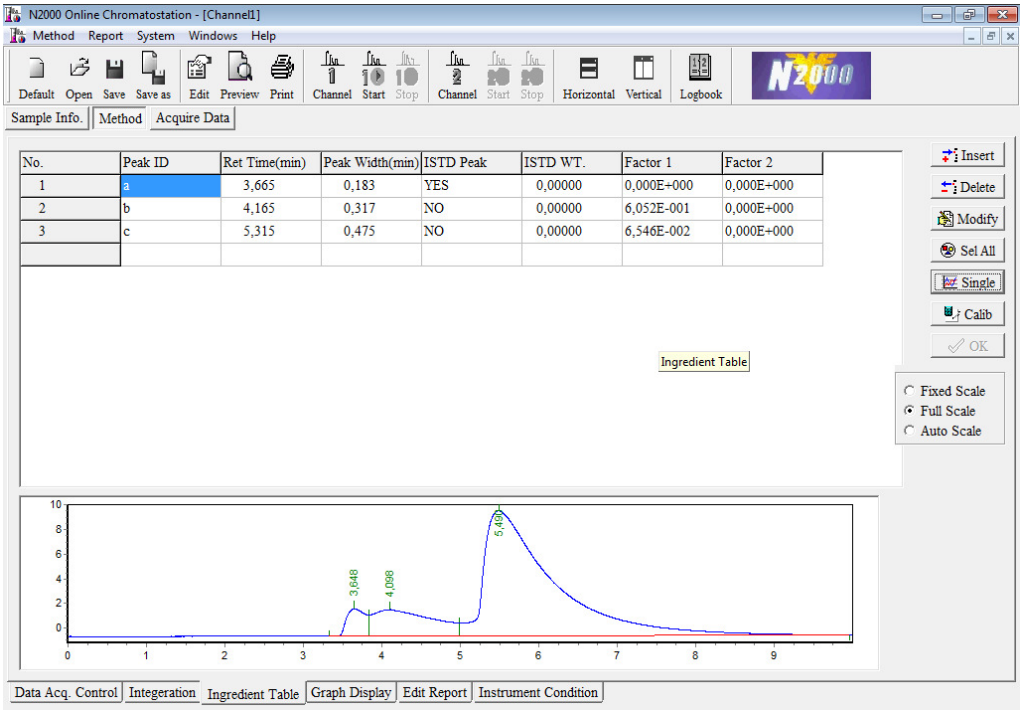
Controle de Aquisição de dados



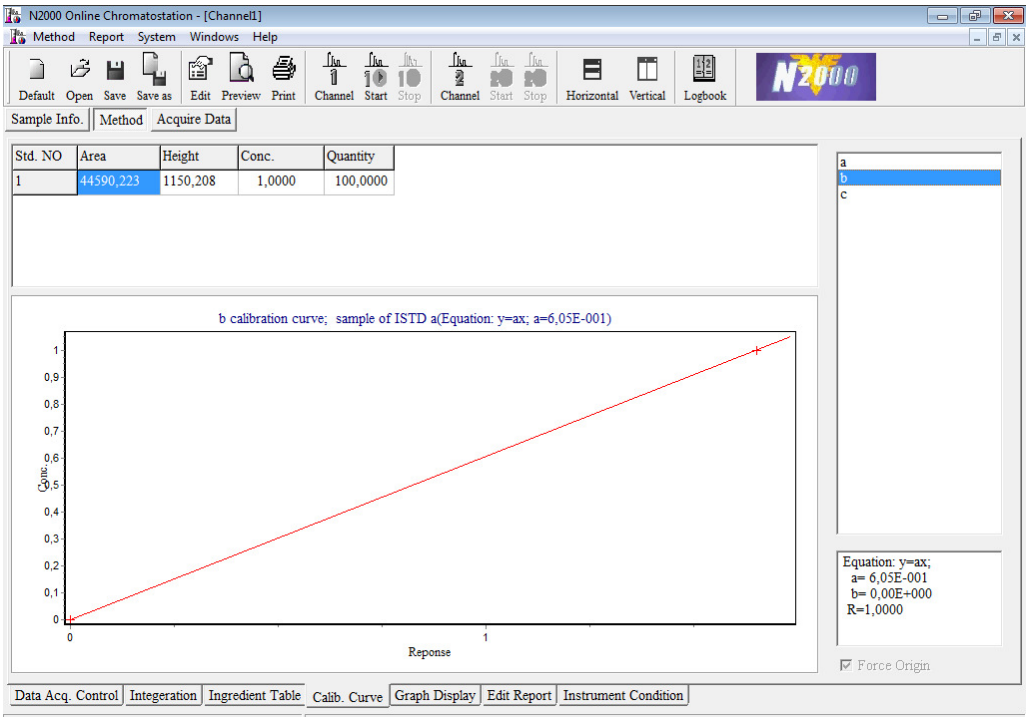
Edição do Processo de Integração


N2000 Online Chromatostation - [Channel1]
Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
Sample Info. Method Acquire Data
Integeration Output
Area
Height
Quantification Method
Area%
ESTD
Norm%
Index
ISTD
Time Width Slope Sample Wt. Min. Area(uV*s) Time Param(min Locking Time(mi Drift
Total Time 5 70,000 1,43000 10,000 0,000 0,000 0,000
Time(min) width(s) Slope Drift Min. Area(uV*s) Time Param(min Locking Marks Tailing Marks Retain Marks
Insert
Delete
Modify
OK
Data Acq. Control Integeration Ingredient Table Graph Display Edit Report Instrument Condition

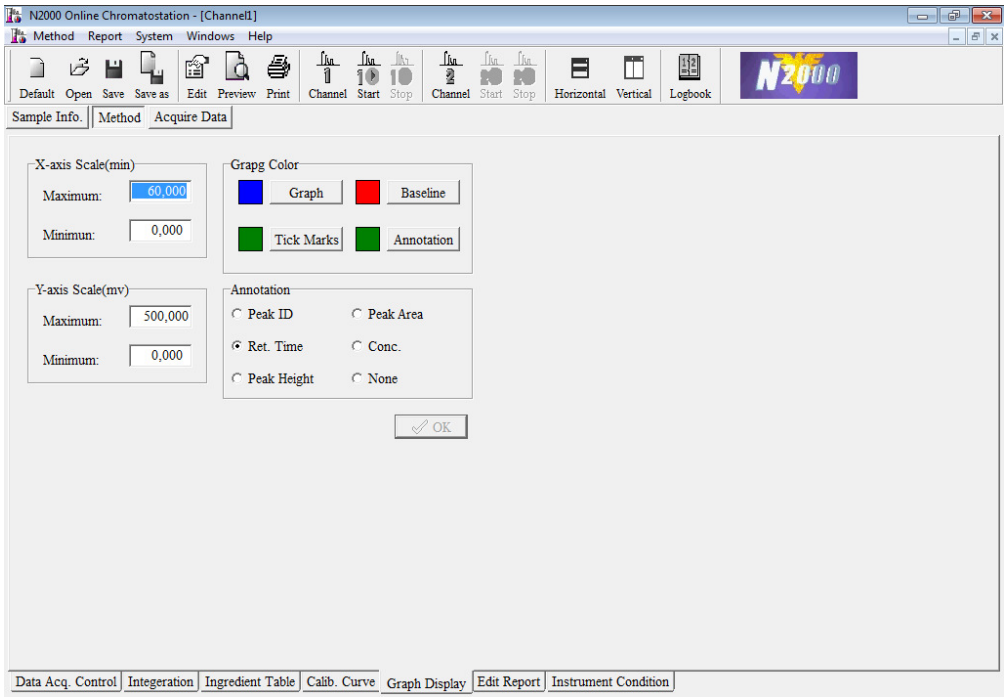
Introdução da Tabela de Ingredientes


N2000 Online Chromatostation - [Channel1]
Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
Sample Info. Method Acquire Data
No. Peak ID Ret Time(min) Peak Width(min) ISTD Peak ISTD WT. Factor 1 Factor 2
1 a 3,665 0,183 YES 0,00000 0,000E+000 0,000E+000
2 b 4,165 0,317 NO 0,00000 6,052E-001 0,000E+000
3 c 5,315 0,475 NO 0,00000 6,546E-002 0,000E+000
Insert
Delete
Modify
Sel All
Single
Calib
OK
Ingredient Table
Fixed Scale
Full Scale
Auto Scale
3,648
4,098
5,409
Data Acq. Control Integeration Ingredient Table Graph Display Edit Report Instrument Condition

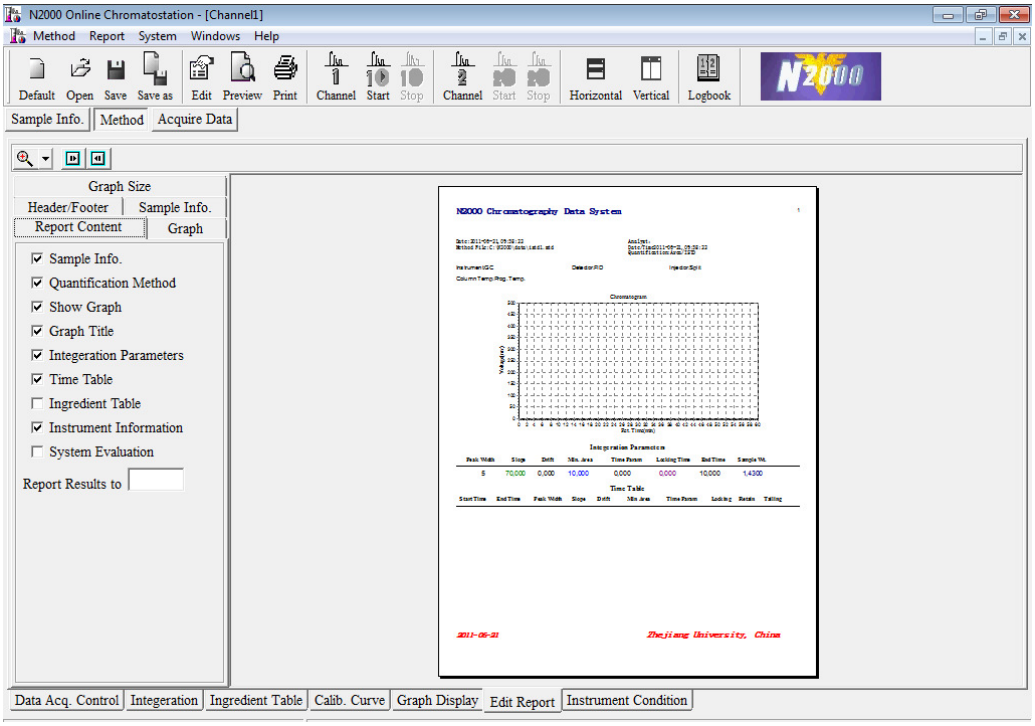
Visualização da Curva de Calibração


N2000 Online Chromatostation - [Channel1]
Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
Sample Info. Method Acquire Data
Std. NO Area Height Conc. Quantity
1 44590,223 1150,208 1,0000 100,0000
a
b
c
b calibration curve; sample of ISTD a(Equation: y=ax; a=6,05E-001)
Conc.
Reponse
Equation: y=ax;
a= 6,05E-001
b= 0,00E+000
R=1,0000
Force Origin
Data Acq. Control Integeration Ingredient Table Calib. Curve Graph Display Edit Report Instrument Condition

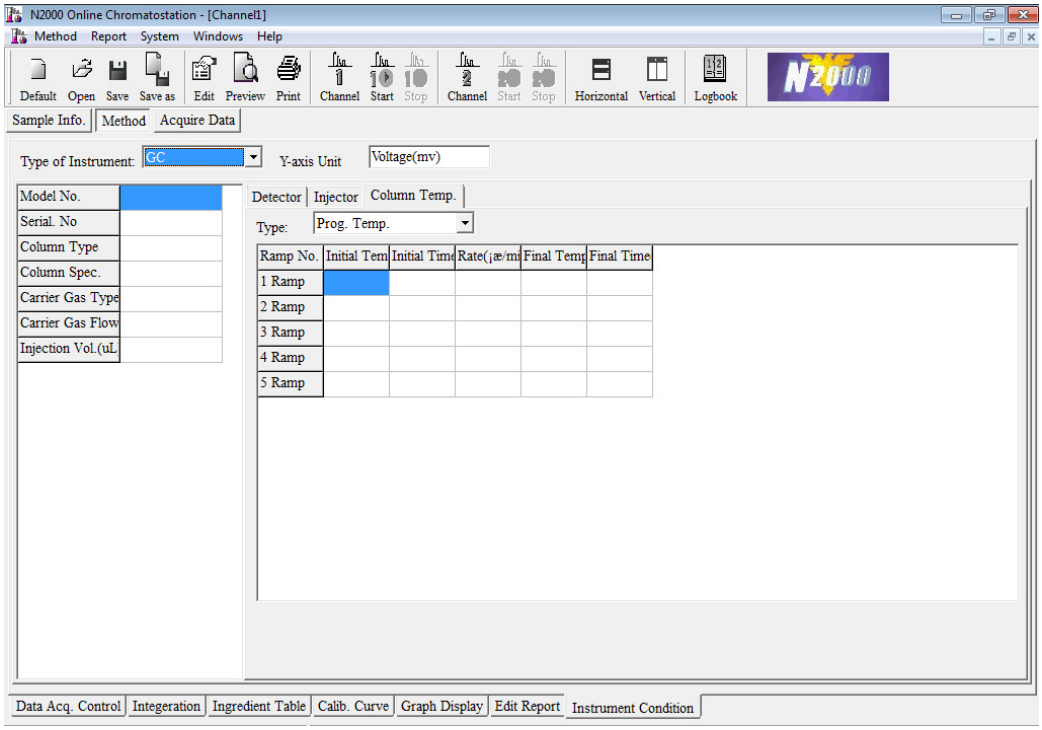
Escolha do Formato de Apresentação do Gráfico


N2000 Online Chromatostation - [Channel1]
Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
Sample Info. Method Acquire Data
X-axis Scale(min)
Maximum: 60,000
Minimun: 0,000
Grapg Color
Graph Baseline
Tick Marks Annotation
Y-axis Scale(mv)
Maximum: 500,000
Minimum: 0,000
Annotation
Peak ID Peak Area
Ret. Time Conc.
Peak Height None
OK
Data Acq. Control Integeration Ingredient Table Calib. Curve Graph Display Edit Report Instrument Condition

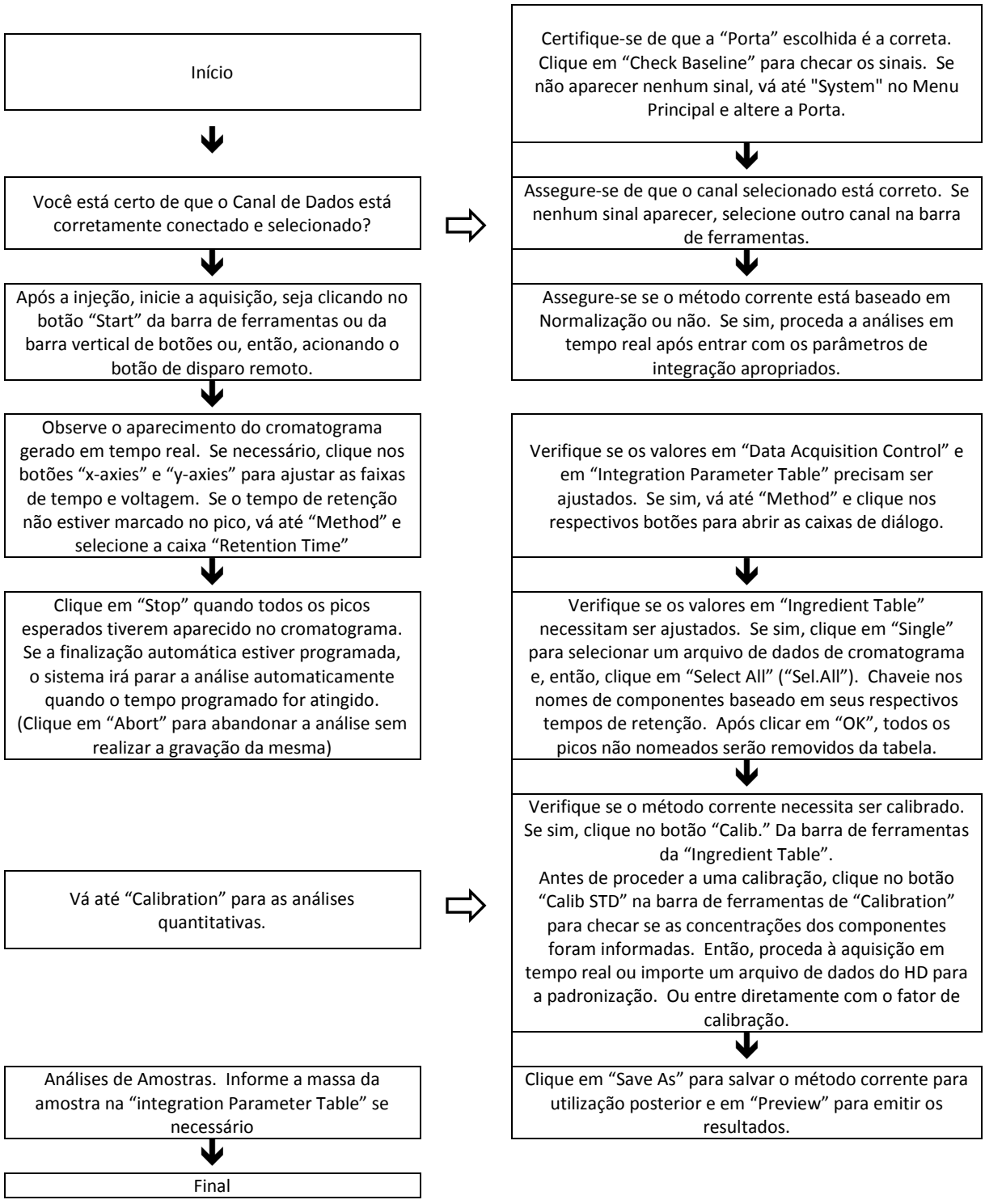
Edição do Relatório da Análise



Introdução das Condições do Instrumento

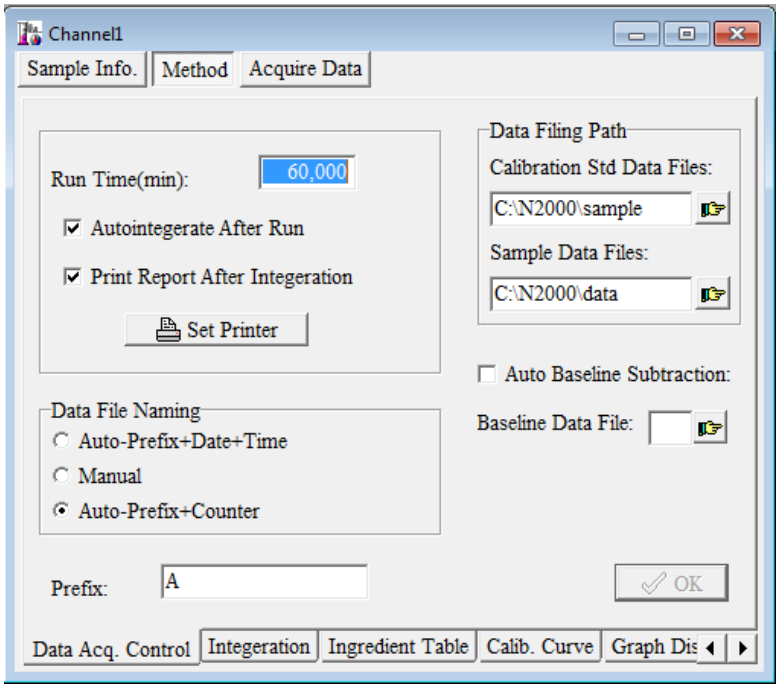

N2000 Online Chromatostation - [Channel1]
Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
Sample Info. Method Acquire Data
Type of Instrument: GC
Y-axis Unit Voltage(mv)
Model No.
Serial. No
Column Type
Column Spec.
Carrier Gas Type
Carrier Gas Flow
Injection Vol.(uL
Detector Injector Column Temp.
Type: Prog. Temp.
Ramp No. Initial Tem Initial Time Rate(¡æ/mi Final Temp Final Time
1 Ramp
2 Ramp
3 Ramp
4 Ramp
5 Ramp
Data Acq. Control Integeration Ingredient Table Calib. Curve Graph Display Edit Report Instrument Condition

5.6. procedimentos Gerais Para Aquisição de Dados em Tempo Real


Início
Você está certo de que o Canal de Dados está corretamente conectado e selecionado?
Após a injeção, inicie a aquisição, seja clicando no botão "Start" da barra de ferramentas ou da barra vertical de botões ou, então, acionando o botão de disparo remoto.
Observe o aparecimento do cromatograma gerado em tempo real. Se necessário, clique nos botões "x-axies" e "y-axies" para ajustar as faixas de tempo e voltagem. Se o tempo de retenção não estiver marcado no pico, vá até "Method" e selecione a caixa "Retention Time"
Clique em "Stop" quando todos os picos esperados tiverem aparecido no cromatograma. Se a finalização automática estiver programada, o sistema irá parar a análise automaticamente quando o tempo programado for atingido. (Clique em "Abort" para abandonar a análise sem realizar a gravação da mesma)
Vá até "Calibration" para as análises quantitativas.
Análises de Amostras. Informe a massa da amostra na "integration Parameter Table" se necessário
Final
Certifique-se de que a "Porta" escolhida é a correta. Clique em "Check Baseline" para checar os sinais. Se não aparecer nenhum sinal, vá até "System" no Menu Principal e altere a Porta.
Assegure-se de que o canal selecionado está correto. Se nenhum sinal aparecer, selecione outro canal na barra de ferramentas.
Assegure-se se o método corrente está baseado em Normalização ou não. Se sim, proceda a análises em tempo real após entrar com os parâmetros de integração apropriados.
Verifique se os valores em "Data Acquisition Control" e em "Integration Parameter Table" precisam ser ajustados. Se sim, vá até "Method" e clique nos respectivos botões para abrir as caixas de diálogo.
Verifique se os valores em "Ingredient Table" necessitam ser ajustados. Se sim, clique em "Single" para selecionar um arquivo de dados de cromatograma e, então, clique em "Select All" ("Sel.All"). Chaveie nos nomes de componentes baseado em seus respectivos tempos de retenção. Após clicar em "OK", todos os picos não nomeados serão removidos da tabela.
Verifique se o método corrente necessita ser calibrado. Se sim, clique no botão "Calib." Da barra de ferramentas da "Ingredient Table".
Antes de proceder a uma calibração, clique no botão "Calib STD" na barra de ferramentas de "Calibration" para checar se as concentrações dos componentes foram informadas. Então, proceda à aquisição em tempo real ou importe um arquivo de dados do HD para a padronização. Ou entre diretamente com o fator de calibração.
Clique em "Save As" para salvar o método corrente para utilização posterior e em "Preview" para emitir os resultados.

5.6.1. Controle de Aquisição de Dados

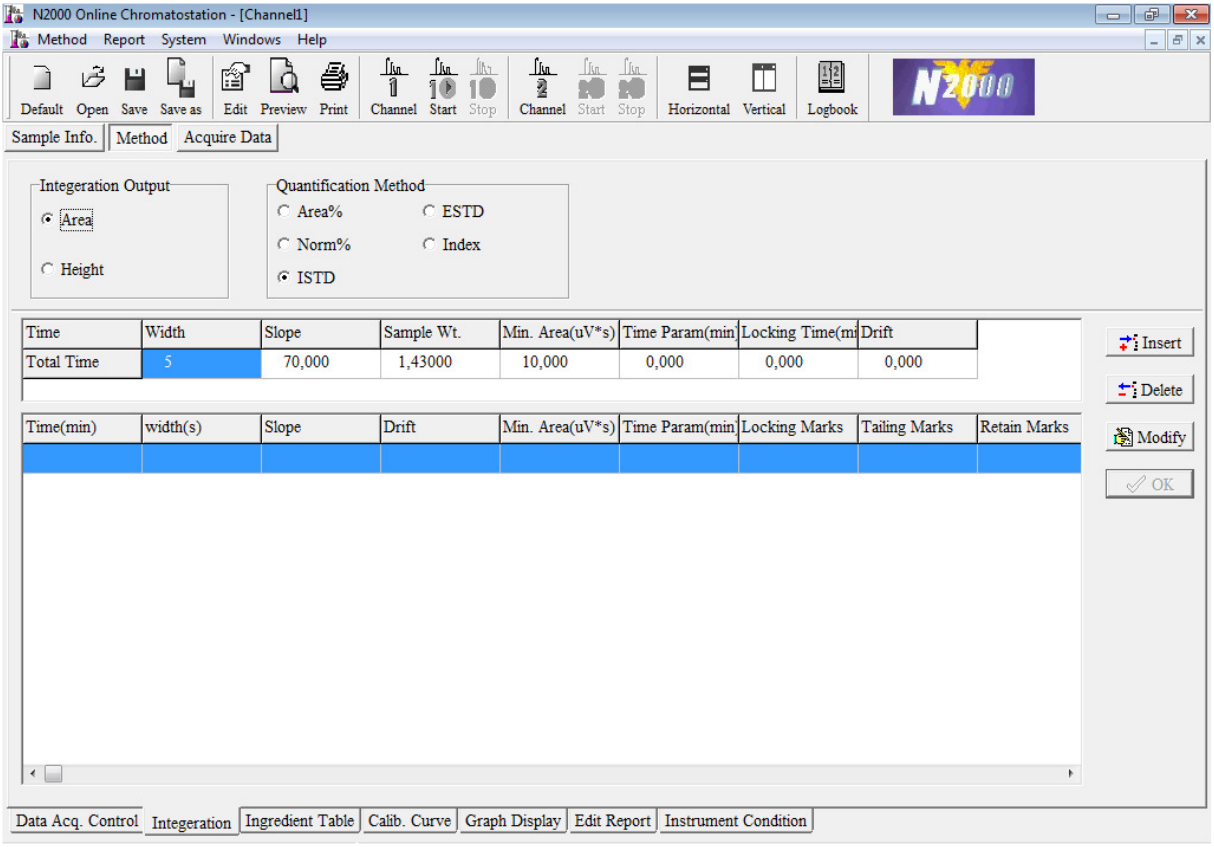
Clique em “Data Acq Control” na bandeira “Method” para visualizar os parâmetros para o controle de aquisição de dados



Tecle um valor para o tempo de corrida. A aquisição de dados irá encerrar-se automaticamente quando o tempo estipulado for atingido. Selecione as caixas “Autointegrate After Run” ou “Print Report After Integration” se desejar. Selecione um sistema de nomeação de arquivo de dados “Data File Naming” e tecle um nome apropriado na caixa “Prefix” para determinar o prefixo a ser utilizado no nome do arquivo. Estipule manualmente o “Data Filing Path” ou utilize o botão indicador para selecionar uma pasta apropriada, caso não queira manter as definições padrão definidas automaticamente na instalação . A linha de base pode ser subtraída de um cromatograma, caso a mesma tendencie (drift) com regularidade

5.6.2. Integração

Clique em “Integration” na bandeira “method” para selecionar o método de quantificação, apresentar a tabela de parâmetros de integração “Integration Parameter Table” e a tabela de sequencia de tempo “Time Sequence Table”.


N2000 Online Chromatostation - [Channel1]
Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
Sample Info. Method Acquire Data
Integeration Output
Area
Height
Quantification Method
Area%
ESTD
Norm%
Index
ISTD
Time Width Slope Sample Wt. Min. Area(uV*s) Time Param(min Locking Time(mi Drift
Total Time 5 70,000 1,43000 10,000 0,000 0,000 0,000
Time(min) width(s) Slope Drift Min. Area(uV*s) Time Param(min Locking Marks Tailing Marks Retain Marks
Insert
Delete
Modify
OK
Data Acq. Control Integeration Ingredient Table Calib. Curve Graph Display Edit Report Instrument Condition

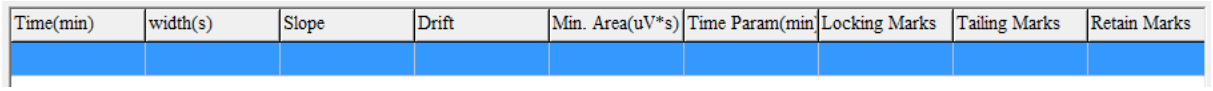
O significado e efeito de cada item na tabela de parâmetros de integração são os seguintes:

Time	Width	Slope	Sample Wt.	Min. Area(uV*s)	Time Param(min	Locking Time(mi	Drift
Total Time	5	70,000	1,43000	10,000	0,000	0,000	0,000

- “Width” – (Largura) apaga todos os picos com largura de pico inferior àquela determinada na tabela;
- “Slope” – (Inclinação ou ruído) apaga todos os picos com inclinação ou ruído inferiores àquele valor determinado na tabela;
- “Sample Wt.” – (Massa da Amostra) não pode ser igual a “zero”. Efetivo para métodos de não-normalização;
- “Min. Area” – (Área Mínima) apaga todos os picos com área inferior àquela determinada na tabela. Utilizado para apagar picos irrelevantes gerados durante a análise, tais como os ruídos eletrônicos do instrumento;
- “Time Param.” – (Parâmetros de Tempo) o “Slope” é reduzido pela metade e o “Width” é duplicado quando o tempo determinado na tabela é atingido;
- “Locking Time” – (Tempo de “Travamento”) utilizado para apagar todos os picos localizados dentro da faixa de tempo determinada pelo comando e registrada na tabela, na intenção de remover picos indesejáveis, tais como picos de ar, solventes de diluição, gerados imediatamente após a injeção;

- "Drift" – (tendência) Para determinar a extensão da variação da linha de base. Determinar "0" para correção automática, ou seja, para traçar automaticamente a linha de base.

O significado e efeito de cada item na tabela de sequência de tempo "Time Sequence Table" são os seguintes:



- "Time" – (tempo) define uma ou mais tabelas de sequencia de tempo para processar os picos que aparecem na faixa de tempo escolhida;
- "Width" – (largura) apaga todos os picos com largura de pico menor que a determinada na tabela;
- "Min.Area" – (Área mínima) apaga todos os picos cuja área seja menor que a determinada na tabela. Utilizado para apagar picos irrelevantes gerados durante a análise, tais como ruídos eletrônicos do instrumento;
- "Slope" – (inclinação ou ruído) apaga todos os picos com slope inferior àquele determinado na tabela;
- "Time Param." – (Parâmetros de Tempo) o "slope" é reduzido pela metade e o "width" é duplicado quando o tempo determinado na tabela é atingido;
- "Locking Time" – (Tempo de "Travamento") utilizado para apagar todos os picos localizados dentro da faixa de tempo determinada pelo comando e registrada na tabela, na intenção de remover picos indesejáveis, tais como picos de ar, solventes de diluição, gerados imediatamente após a injeção;
- "Tailing Marks" – (Marcas de "Encaudamento") trata todos os picos que aparecem no intervalo de tempo determinado na tabela como "Picos Encaudados", ou seja, a linha de base de cada pico é determinada independentemente;
- "Retain Marks" – (Marcas de Retenção) trata todos os picos que aparecem no intervalo de tempo determinado na tabela como tendo a mesma linha de base.

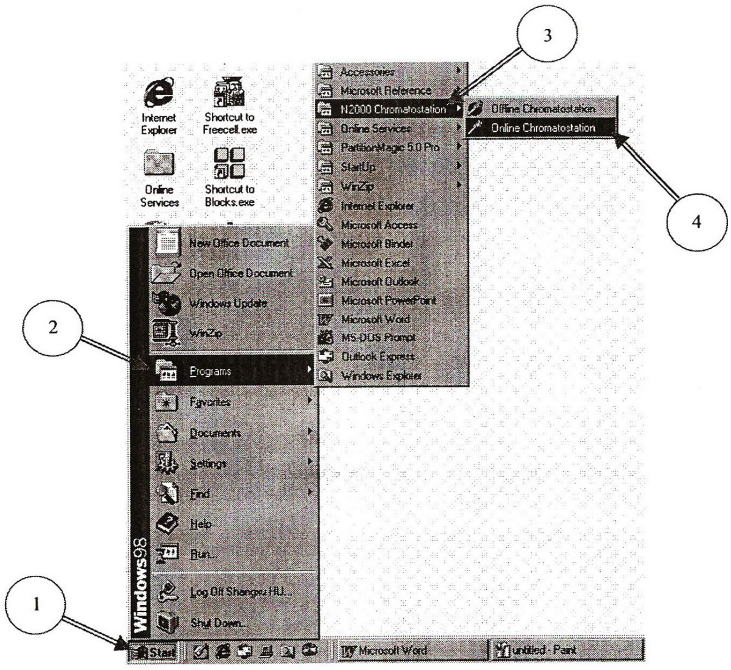
5.6.3. Tabela de Ingredientes ("Ingredient Table")

Quando um Método de Padronização Interna é utilizado como método de quantificação, o pico do padrão interno deverá aparecer antes de todos os outros na Tabela de Ingredientes. Se este não for o caso, você poderá mover o pico do padrão interno para o topo da tabela de ingredientes clicando duas vezes no ISTD Peak na tabela de ingredientes e selecionando "YES" e, então, entrando com um valor para a massa do padrão interno (ISTD Weight).

Capítulo 6 – Inicializando

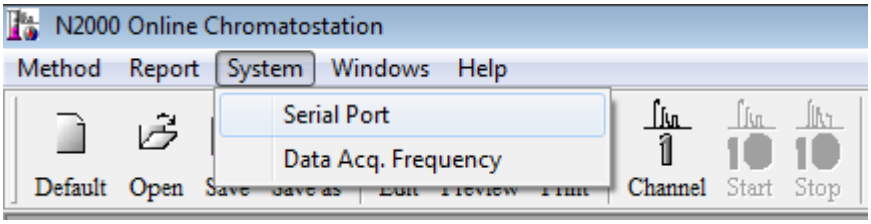
6.1. Abrindo a Estação De Trabalho N2000

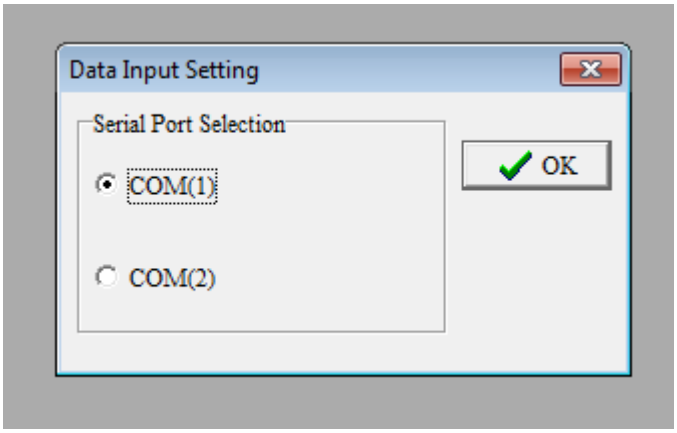
Ligue o PC e aguarde a inicialização do Windows. Clique em Iniciar e vá até Programas e mova o cursos até N2000 Chromatostation, selecionando, a seguir, Online Chromatostation. Ou, se tiver criado atalhos no Desktop durante a instalação, clique duas vezes no atalho Online Chromatostation.



6.2. Selecione Uma Porta Serial

Vá até “System” no Menu Principal e selecione “Serial Port”. Selecione a caixa apropriada na janela de diálogo e, então, clique em “OK” para ativar a seleção

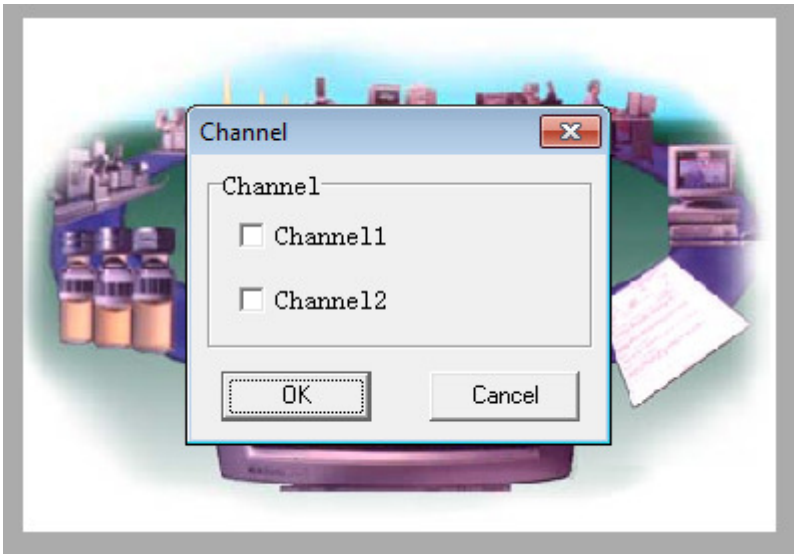




Se não houver comunicação entre o Sistema de Dados Cromatográficos e o PC, como se evidencia pela ausência de sinal na janela de aquisição de dados em tempo real, você pode ter que trocar a porta serial. Depois que a porta serial for trocada, primeiro feche a estação de trabalho, reabrindo-a, em seguida, para que a mesma possa detectar a mudança.

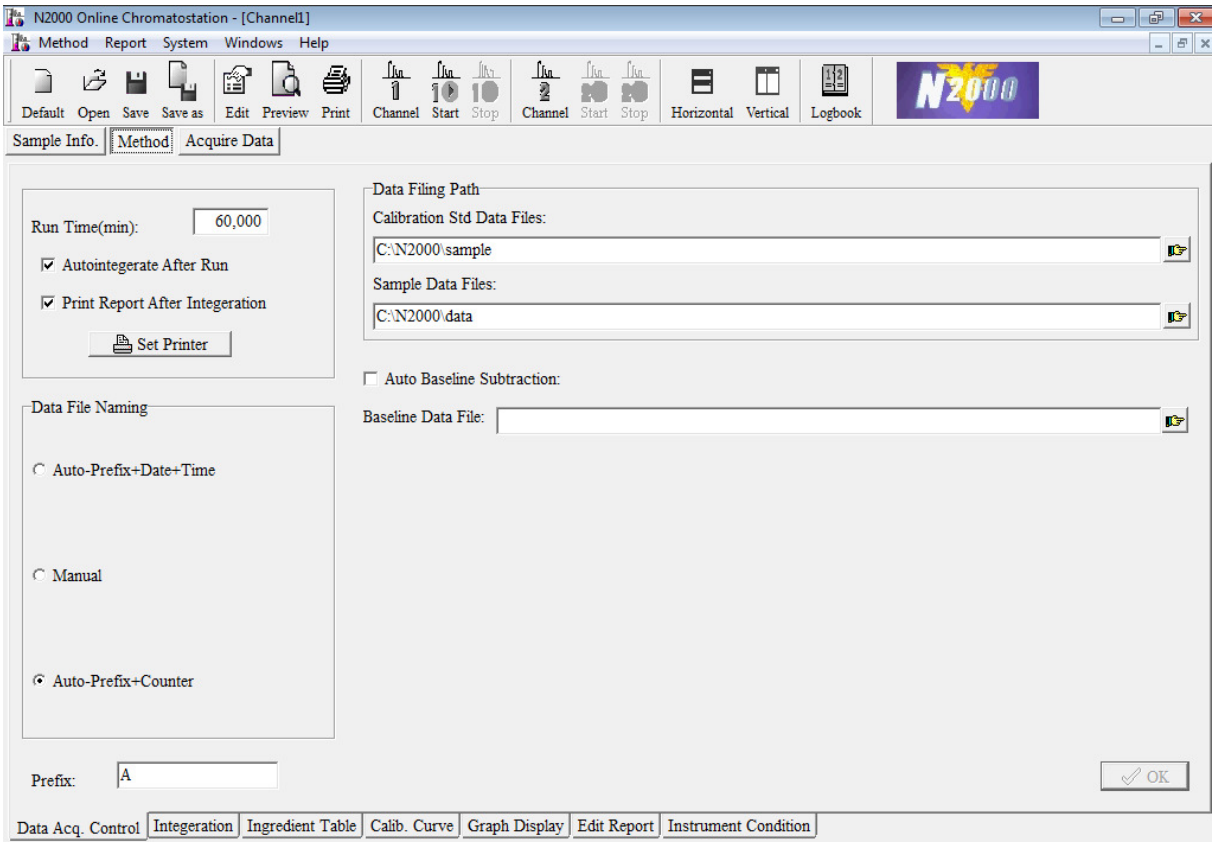
6.3. Selecione Um Canal de Sinal

Depois de abrir a Estação de Trabalho N2000, uma janela de diálogo é apresentada. Selecione o canal apropriado e assegure-se de que o mesmo corresponda ao cabo de sinal conectado ao detector a ser utilizado. Clique em "OK" para entrar na Estação de Trabalho OnLine.



6.4. Entrando com Controle de Aquisição de Dados

Vá até a página "Method" e clique em "Data Acq Control" para selecionar as indicações apropriadas. Insira um valor apropriado para o tempo da corrida (Run Time) e selecione "Autointegrate After Run" e / ou "Print Report After Run" se for desejado. Selecione um método de nomeação do arquivo de dados (Data Filing Naming), sendo que o método padrão de instalação é utilizando Prefixo Automático + Contador (Auto-Prefix+Counter). Insira o caminho para o "Calibration Standard Data File" (Arquivo de Dados de Calibração de Padrão) e o caminho para o "Sample Data File" (Arquivo de Dados de Amostra). Clique em "OK" para ativar as informações fornecidas.



6.4.1. **"Run Time" (Tempo da Corrida)** – Tecle o valor apropriado na caixa. Se o valor não for correto, o botão "OK" não será habilitado.

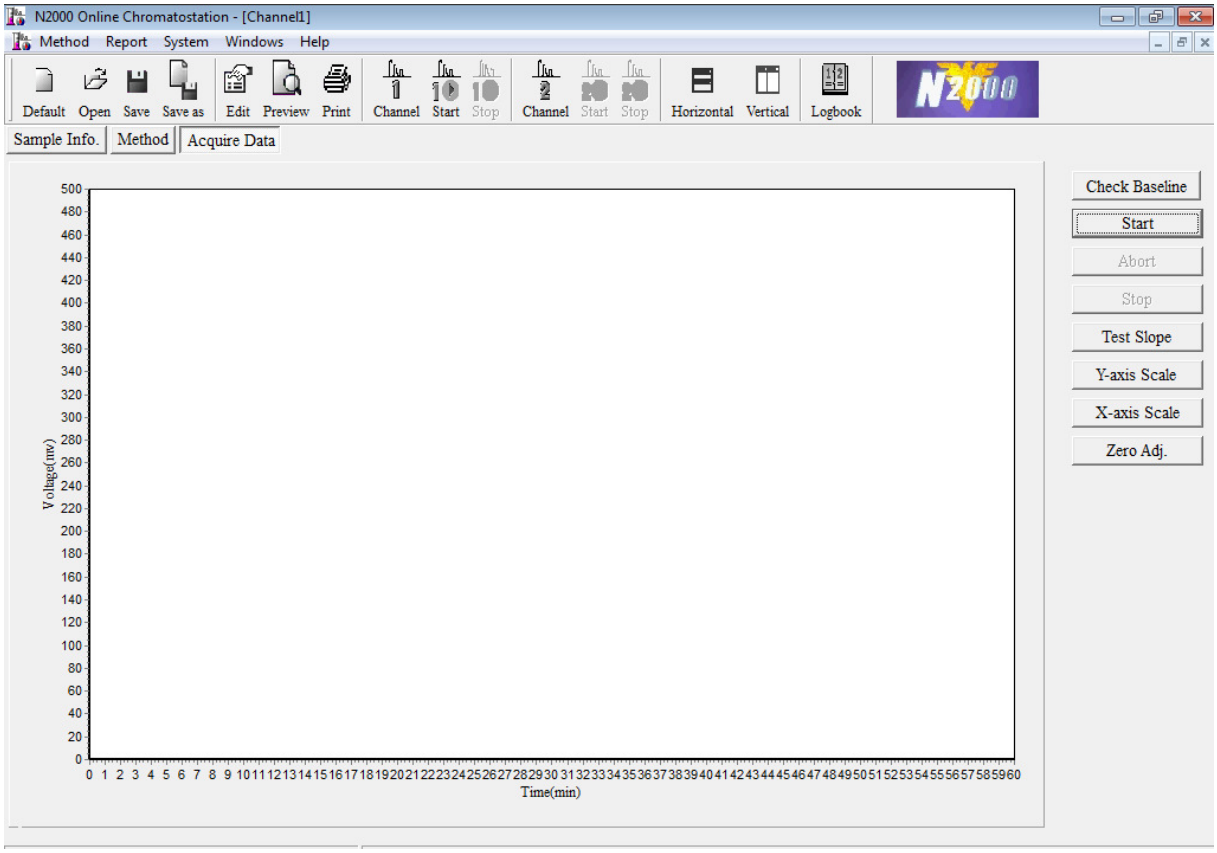
6.4.2. **"Print Report After Integration" (Imprimir Relatório Após Integração)** – Desabilite a caixa caso não seja uma função desejada.

6.4.3. **"Add Prefix" (Adicionar Prefixo)** – Tecle uma letra ou uma palavra como prefixo a ser utilizado para nomear o arquivo de dados. Clique em "OK" para ativas as alterações.

6.5. Injetar uma Amostra

Vá até "Acquire Data" (Adquirir Dados) para visualizar a janela de aquisição de dados em tempo real, como mostrada abaixo. Há quatro maneiras de disparar um cromatograma.

Primeiro, clicando no Botão “Start”, na barra vertical localizada à direita da tela. Segundo, pressionando o botão de Disparo Remoto no respectivo cabo. Terceiro, clicando no Ícone “Start”, situado na barra de ferramentas. Quarto, selecionando o Botão “Start” na barra vertical através da tecla “TAB” e pressionando a tecla “Enter”. Clique no botão “Zero Adj.” Para zerar a linha de base e, então, “Start” para disparar e iniciar a gravação do sinal. Ajuste x-axis (tempo) e y-axis (voltagem), para valores apropriados para que o cromatograma caiba na janela.



Observe, no cromatograma, se os tempos de retenção estão marcados nos picos. Caso não, vá até “Method” e assegure-se de que “Autointegrate After Run” esteja selecionado.
Quando todos os componentes tiverem sido eluídos, clique em “Stop” para encerrar a aquisição. Caso o tempo de corrida pré-definido tenha sido atingido, a gravação do sinal será automaticamente encerrada. Salve o arquivo de dados do cromatograma com um nome apropriado, finalizado com a extensão .DAT, no caminho apropriado. Caso deseje abandonar a corrida antes do término sem gravar o arquivo, clique em “Abort” para que a mesma seja finalizada e nenhum dado correspondente a ela seja gravado. Clique em “Stop” para encerrar a corrida. Salve o arquivo de dados na pasta apropriada para análises posteriores.

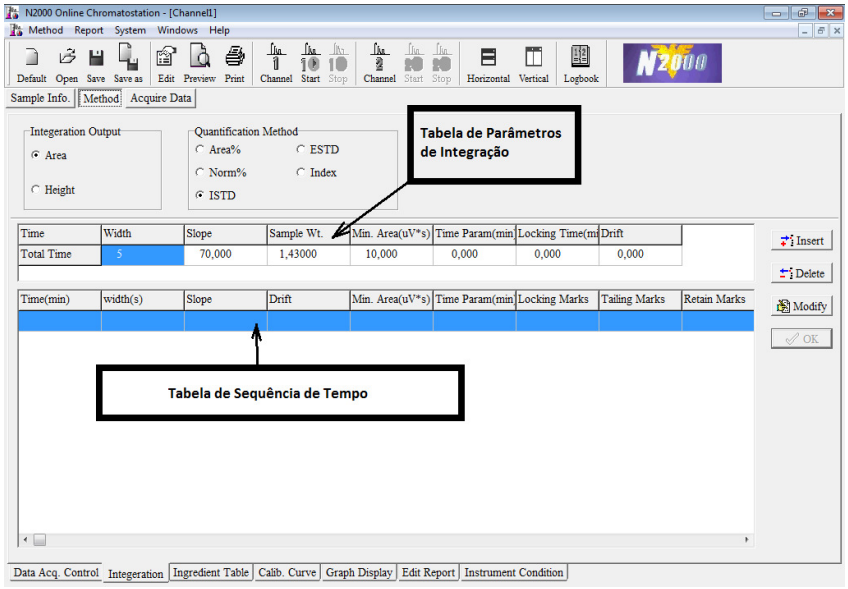
Dicas: Caso precise ampliar algum segmento do cromatograma, simplesmente clique e segure o botão esquerdo do mouse e arraste-o para o outro ponto desejado para marcar o

segmento de interesse do cromatograma. O segmento de cromatograma selecionado irá ocupar toda a janela assim que o botão do mouse for solto. Caso necessário, outro zoom poderá ser aplicado sobre o segmento, para ampliar um sub-segmento deste. Simplesmente clique e segure o botão esquerdo do mouse e arraste-o em direção inversa ou marque uma área de tamanho arbitrário para inverter o zoom e retornar ao tamanho original do cromatograma.

Se você desejar expandir apenas o segmento da linha de base, ou seja, uma expansão vertical, você pode fazê-lo apenas truncando o último dígito do valor da voltagem ou do tempo. O cromatograma irá expandir verticalmente sem alterar a escala horizontal ou expandir horizontalmente sem alterar a escala vertical.

Capítulo 7 – Procedimentos para Calibradores de Cálculos

1. Obtenha um cromatograma. Proceda à aquisição de um cromatograma de uma amostra padrão, como já foi descrito anteriormente.
2. Selecione o Método de Integração. Vá até a página "Integration". Selecione um modo de referencial, ou seja, por Área ou por Altura do pico, dependendo do que será utilizado para sua análise quantitativa. Clique para selecionar um método de integração apropriado e edite a Tabela de Parâmetros de integração e a Tabela de Sequencia de Tempo.


N2000 Online Chromatostation - [Channel1]
Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
Sample Info. Method Acquire Data
Integration Output
Area
Height
Quantification Method
Area%
ESTD
Norm%
Index
ISTD
Tabela de Parâmetros de Integração
Time Width Slope Sample Wt. Min. Area(uV*s) Time Param(min Locking Time(m Drift
Total Time 5 70,000 1,43000 10,000 0,000 0,000 0,000
Insert
Delete
Modify
OK
Time(min) width(s) Slope Drift Min. Area(uV*s) Time Param(min Locking Marks Tailing Marks Retain Marks
Tabela de Sequência de Tempo
Data Acq. Control Integration Ingredient Table Calib. Curve Graph Display Edit Report Instrument Condition

Você pode escolher um entre cinco métodos de quantificação disponíveis, que são:

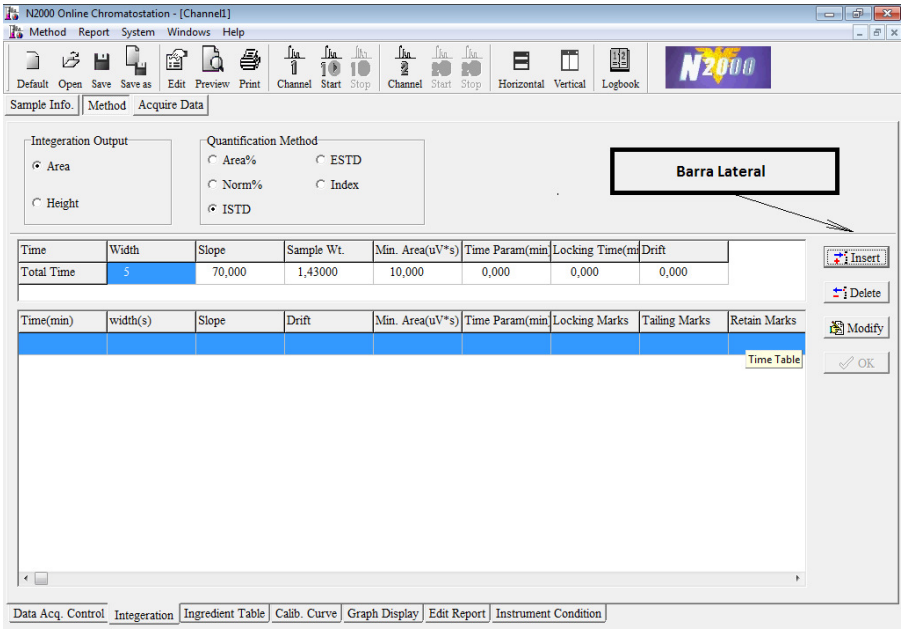
a. Normalização de Área (Área%)
b. Normalização por Calibrador (Norm%)
c. Padrão Interno (ISTD)
d. Padrão Externo (ESTD)
e. Índice de Retenção (Index)

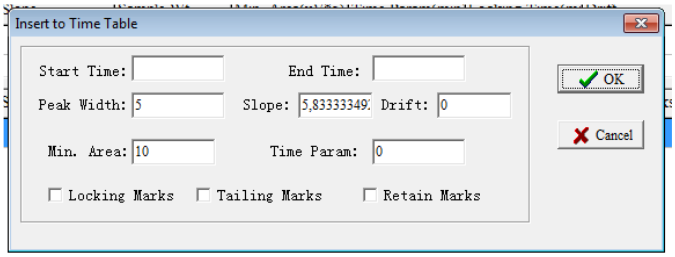
Eles podem ser utilizados para diferentes propósitos como explicado a seguir:

1) Área% - Este método expressa o resultado do cálculo em porcentagem como razão entre a área individual do pico e a soma total das áreas de todos os picos presentes no cromatograma. Qualquer valor acima de 0,0% irá indicar a presença de um composto em particular. Se houverem 10 componentes, haverá 10 valores adicionados para chegar aos 100%.

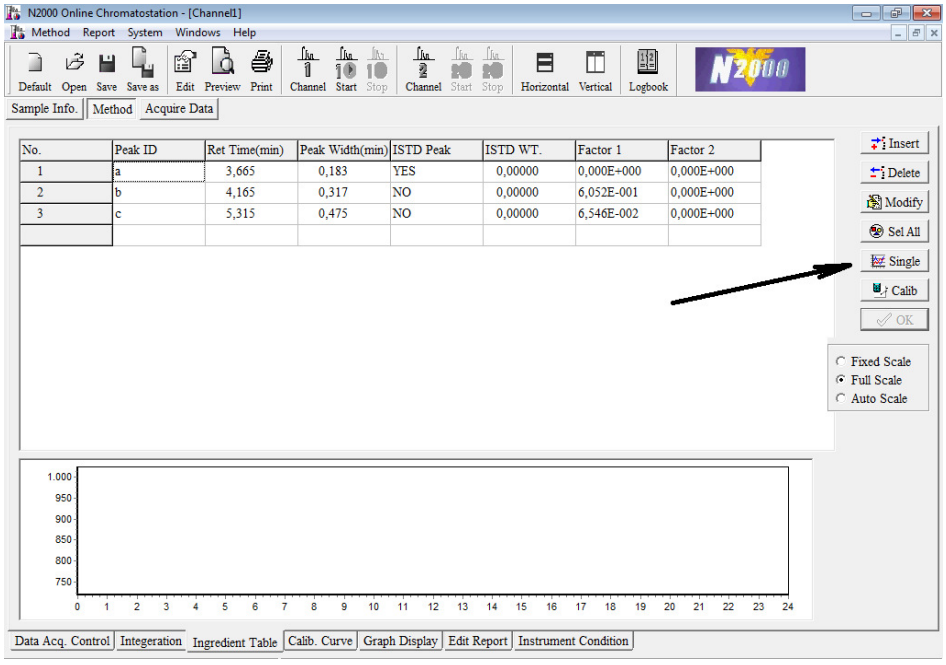
2) Norm% - Este método também expressa os resultados dos cálculos em porcentagem, mas apenas pra os componentes identificados na tabela de ingredientes. Qualquer valor acima de 0,0% irá indicar a presença de um composto em particular. Se houverem 10 componentes, haverá 10 valores adicionados para chegar aos 100%.
3) ISTD ou ESTD – Estes métodos calculam e expressam os resultados dos cálculos em termos absolutos. Estes métodos obrigam a necessidade de se obter primeiramente os calibradores, média dos calibradores ou construir curvas de calibração para os componentes de interesse. Eles são, então, utilizados para determinar a concentração dos componentes de interesse em uma amostra.

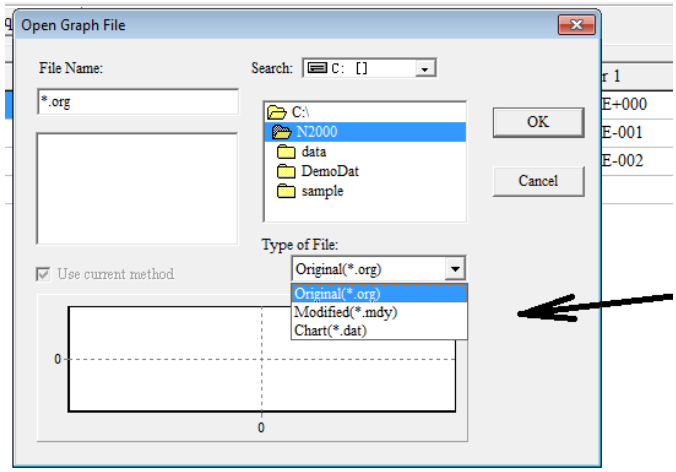
3. Edite a Tabela de Parâmetros de Integração. Tecle os valores apropriados para a Tabela de Parâmetros de Integração.
4. Edite a Tabela de Sequencia de Tempo. Clique em “Insert” na barra lateral para ativar uma janela de diálogo “Insert to Time Table” (Inserir na Tabela de Tempo). Insira os valores apropriados para Tempo Inicial e Tempo Final. Atente para o fato de que o tempo inicial não poderá ser “0,0” e o tempo final não pode se sobrepor àqueles registrados em Tabelas de Sequencia de Tempo anteriores. Selecione a opção de interesse “Locking Marks”, "Tailing Marks" ou "Retain Marks”. “Locking Marks” significa que todos os picos na faixa de tempo selecionada serão travados e desmarcados, ou seja, não serão integrados. “Tailing Marks” significa que todos os picos na faixa de tempo selecionada serão tratados como picos caudados, ou seja, a linha de base de cada pico será traçada de vale a vale. “Retain Marks” significa que todos os picos na faixa de tempo selecionada serão integrados utilizando a mesma linha de base.


N2000 Online Chromatostation - [Channel1]
Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
Sample Info. Method Acquire Data
Integeration Output
Area
Height
Quantification Method
Area%
ESTD
Norm%
Index
ISTD
Barra Lateral
Time Width Slope Sample Wt. Min. Area(uV*s) Time Param(min Locking Time(m Drift
Total Time 5 70,000 1,43000 10,000 0,000 0,000 0,000
Time(min) width(s) Slope Drift Min. Area(uV*s) Time Param(min Locking Marks Tailing Marks Retain Marks
Insert
Delete
Modify
OK
Time Table
Data Acq. Control Integeration Ingredient Table Calib. Curve Graph Display Edit Report Instrument Condition

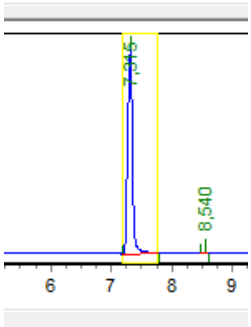


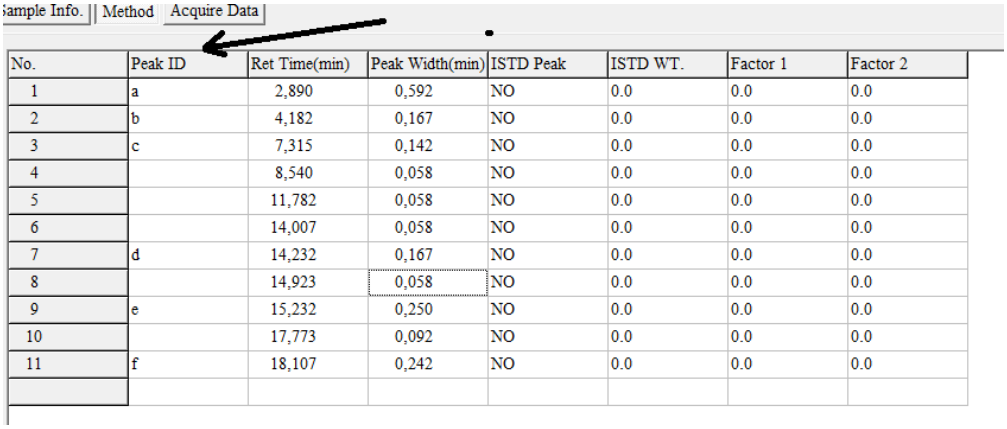
5. Proceda à abertura da Tabela de Ingredientes (“Ingredient Table”) em “Method”. Clique em “Single” na barra lateral para abrir a janela de diálogo “Open Graph File”. Selecione o arquivo de dados a ser processado, no disco e caminho apropriados. Note que há três tipos de arquivos utilizados na estação de trabalho: arquivo de resultados de processo original (*.ORG), arquivo de resultados modificados (*.MDY) e arquivo de dados de cromatograma (*.DAT). O cromatograma dos padrões é salvo em formato *.dat. Clique em seta para baixo para selecionar o tipo de arquivo.


N2000 Online Chromatostation - [Channel1]
Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
Sample Info. Method Acquire Data
No. Peak ID Ret Time(min) Peak Width(min) ISTD Peak ISTD WT. Factor 1 Factor 2
1 a 3,665 0,183 YES 0,00000 0,000E+000 0,000E+000
2 b 4,165 0,317 NO 0,00000 6,052E-001 0,000E+000
3 c 5,315 0,475 NO 0,00000 6,546E-002 0,000E+000
Insert
Delete
Modify
Sel All
Single
Calib
OK
Fixed Scale
Full Scale
Auto Scale
Data Acq. Control Integeration Ingredient Table Calib. Curve Graph Display Edit Report Instrument Condition

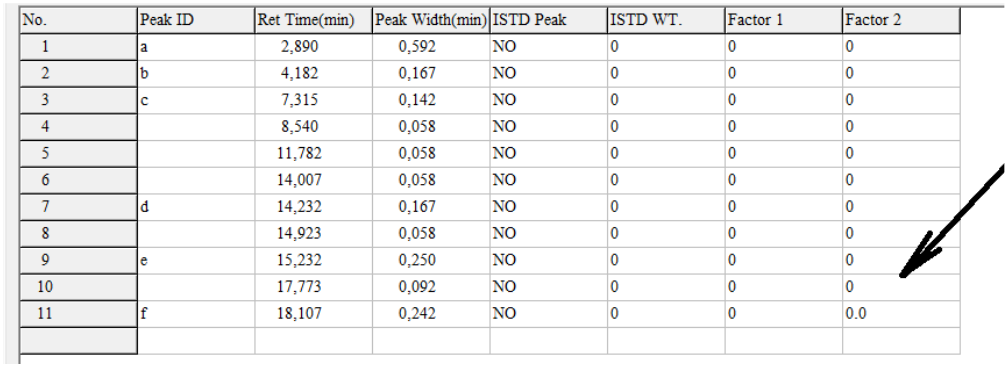


6. Após o cromatograma selecionado estar apresentado, edite a tabela de ingredientes utilizando os botões “Insert”, ou “Delete”, ou “Modify ou “Select All”. Há três maneiras de inserir dados. Primeiro, quando o botão “Insert” é ativado, uma janela de diálogo “Input Compound Information” é aberta. Insira o nome do composto, tempo de retenção, largura de pico e selecione o tipo apropriado de largura de pico. A segunda maneira de inserir dados é posicionando o cursor no pico de interesse e pressionando “Enter” enquanto mantém a tecla “Shift” pressionada. O pico selecionado é marcado com uma moldura amarela. Clique, então, no botão “Insert” para abrir a janela de “Input Compound Information” para inserir os dados correspondentes. A terceira maneira de inserir dados é com o botão “Select All”. O sistema irá coletar e inserir os tempos de retenção e larguras de pico de todos os picos do cromatograma. Selecione os picos de interesse, identifique-os, digitando seus nomes na janela correspondente, elimine todos os pontos flutuantes (pontos decimais) que estiverem com “.”, substituindo-os por “,” quando o valor não for “0” e apenas digitando “0” quando o valor for “0” e, depois, clique no botão “OK” para remover os dados dos picos não identificados.

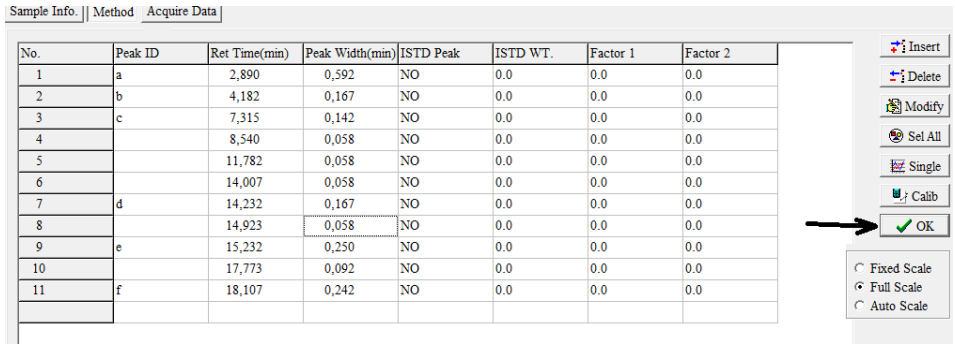



Sample Info. | Method | Acquire Data

No.	Peak ID	Ret Time(min)	Peak Width(min)	ISTD Peak	ISTD WT.	Factor 1	Factor 2
1	a	2,890	0,592	NO	0.0	0.0	0.0
2	b	4,182	0,167	NO	0.0	0.0	0.0
3	c	7,315	0,142	NO	0.0	0.0	0.0
4		8,540	0,058	NO	0.0	0.0	0.0
5		11,782	0,058	NO	0.0	0.0	0.0
6		14,007	0,058	NO	0.0	0.0	0.0
7	d	14,232	0,167	NO	0.0	0.0	0.0
8		14,923	0,058	NO	0.0	0.0	0.0
9	e	15,232	0,250	NO	0.0	0.0	0.0
10		17,773	0,092	NO	0.0	0.0	0.0
11	f	18,107	0,242	NO	0.0	0.0	0.0

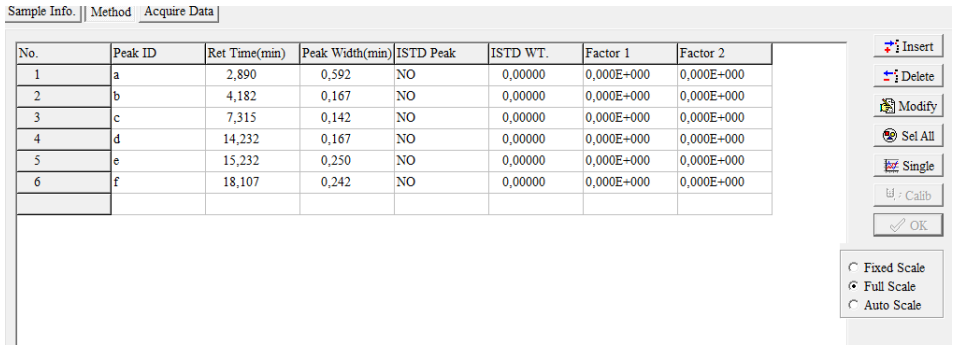


No.	Peak ID	Ret Time(min)	Peak Width(min)	ISTD Peak	ISTD WT.	Factor 1	Factor 2
1	a	2,890	0,592	NO	0	0	0
2	b	4,182	0,167	NO	0	0	0
3	c	7,315	0,142	NO	0	0	0
4		8,540	0,058	NO	0	0	0
5		11,782	0,058	NO	0	0	0
6		14,007	0,058	NO	0	0	0
7	d	14,232	0,167	NO	0	0	0
8		14,923	0,058	NO	0	0	0
9	e	15,232	0,250	NO	0	0	0
10		17,773	0,092	NO	0	0	0
11	f	18,107	0,242	NO	0	0	0.0


Sample Info. | Method | Acquire Data

No.	Peak ID	Ret Time(min)	Peak Width(min)	ISTD Peak	ISTD WT.	Factor 1	Factor 2
1	a	2,890	0,592	NO	0.0	0.0	0.0
2	b	4,182	0,167	NO	0.0	0.0	0.0
3	c	7,315	0,142	NO	0.0	0.0	0.0
4		8,540	0,058	NO	0.0	0.0	0.0
5		11,782	0,058	NO	0.0	0.0	0.0
6		14,007	0,058	NO	0.0	0.0	0.0
7	d	14,232	0,167	NO	0.0	0.0	0.0
8		14,923	0,058	NO	0.0	0.0	0.0
9	e	15,232	0,250	NO	0.0	0.0	0.0
10		17,773	0,092	NO	0.0	0.0	0.0
11	f	18,107	0,242	NO	0.0	0.0	0.0

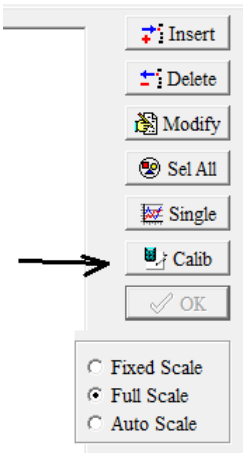
Insert
Delete
Modify
Sel All
Single
Calib
OK
Fixed Scale
Full Scale
Auto Scale


Sample Info. | Method | Acquire Data

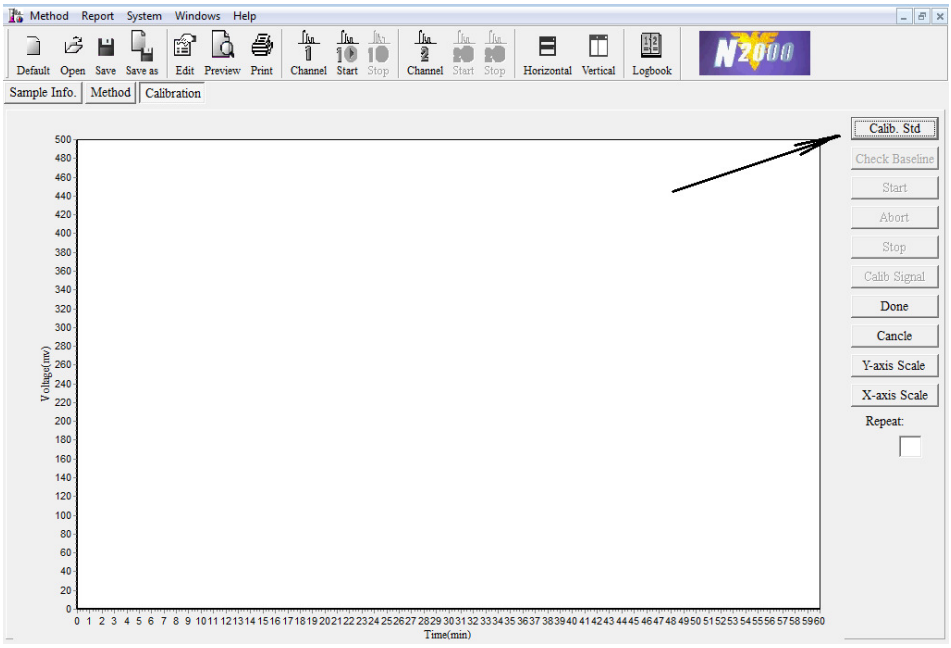
No.	Peak ID	Ret Time(min)	Peak Width(min)	ISTD Peak	ISTD WT.	Factor 1	Factor 2
1	a	2,890	0,592	NO	0,00000	0,000E+000	0,000E+000
2	b	4,182	0,167	NO	0,00000	0,000E+000	0,000E+000
3	c	7,315	0,142	NO	0,00000	0,000E+000	0,000E+000
4	d	14,232	0,167	NO	0,00000	0,000E+000	0,000E+000
5	e	15,232	0,250	NO	0,00000	0,000E+000	0,000E+000
6	f	18,107	0,242	NO	0,00000	0,000E+000	0,000E+000

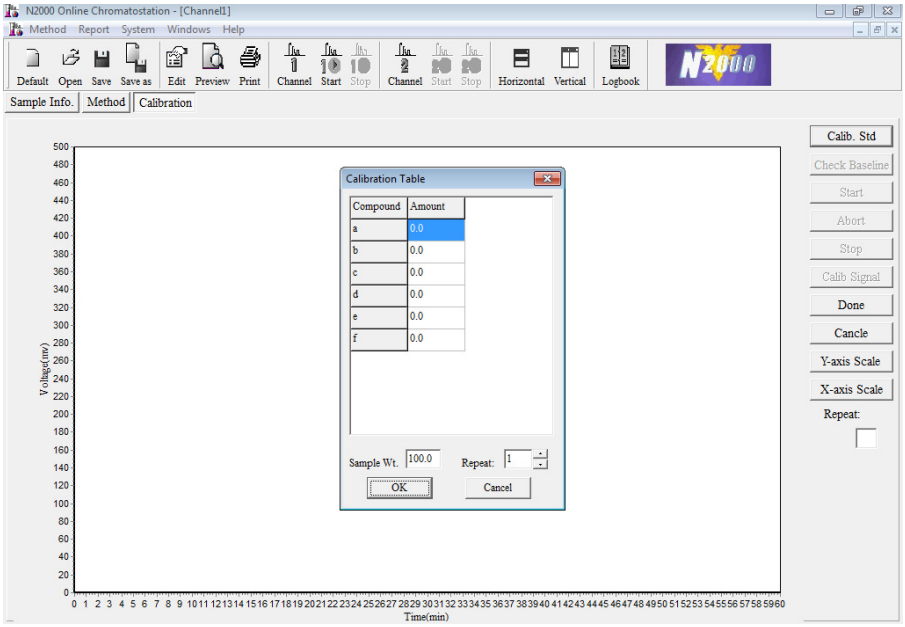
Insert
Delete
Modify
Sel All
Single
Calib
OK
Fixed Scale
Full Scale
Auto Scale

7. Se “ISTD” ou “ESTD” (Concentração por Padrão Interno ou por Padrão Externo) for selecionado no Método de Quantificação na página “Method”, o botão “Calib” na barra lateral será habilitado. Clique em “Calib” para ativar o processo de calibração.

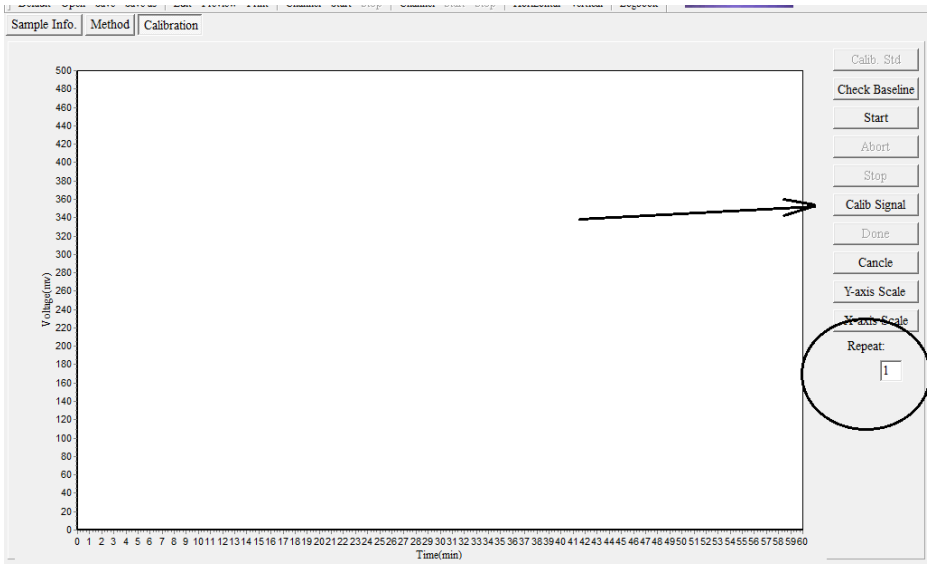


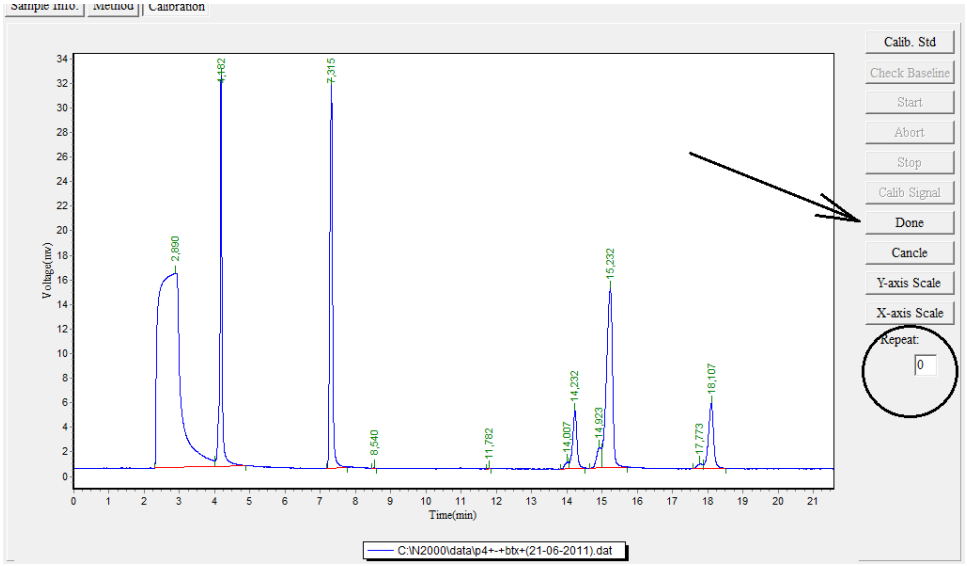
8. Clique no botão “Calib STD” na barra direita para ativar a janela de diálogo “Calibration Table”.





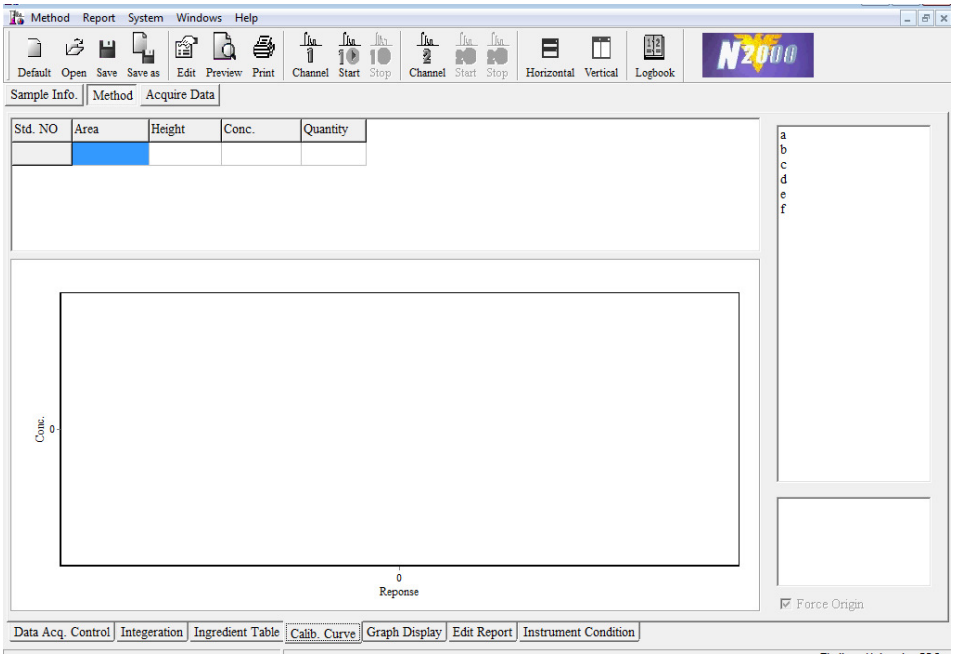
Insira as concentrações ou porcentagens dos respectivos compostos. Clique em seta para cima ou para baixo para selecionar o número de repetições. Elimine o "." Na janela Sample Wt. Clique em "OK" para finalizar uma calibração. Caso o número na janela de repetições não chegue a "0", o botão "Done" não será habilitado. Clique em "Calib Signal" e selecione novamente o cromatograma.



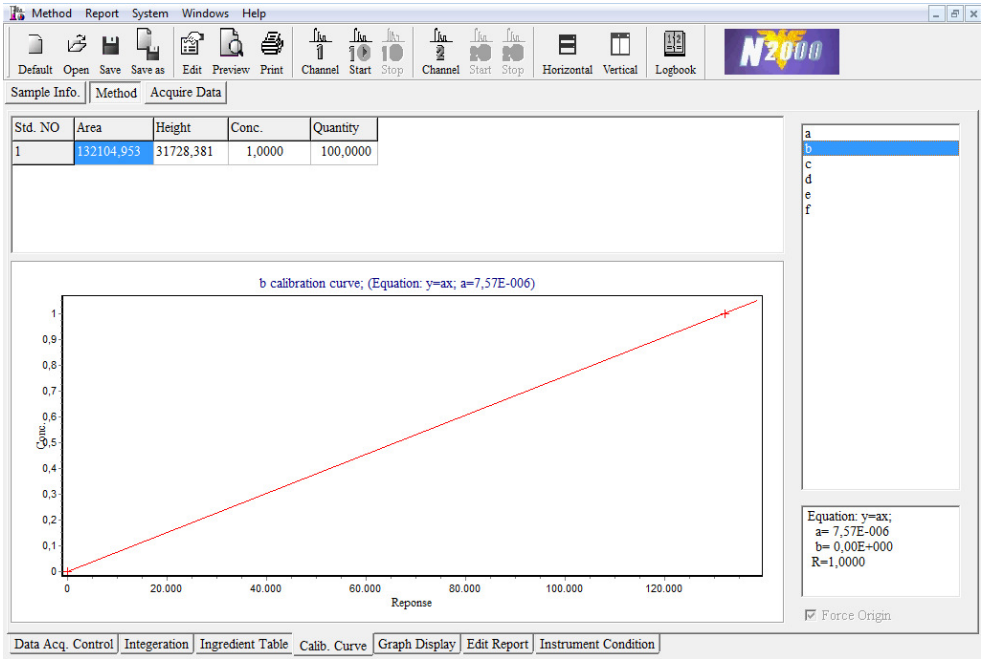


Clique em "Done" para terminar a calibração. Caso sejam necessárias múltiplas injeções do padrão para obter um calibrador médio, simplesmente selecione a quantidade de repetições, no início da calibração e repita os procedimentos acima até que o botão "Done" seja habilitado.

9. Visualize as Curvas de Calibração. Clicando o botão "Done" será ativada uma nova janela para Curvas de Calibração.



Selecione o nome do componente na caixa localizada no canto superior direito da janela para visualizar as respectivas curvas de calibração



10. Clique em “Save as” para salvar o método para uso posterior. O arquivo de método será salvo com o formato *.MTD.
11. Correndo uma Análise de Amostra. Proceda à injeção da amostra e dispara a coleta de dados. Quando todos os picos forem eluídos, clique em “Stop”. Caso tenha programado um tempo de final de corrida, a estação de trabalho efetuará o encerramento do processo de coleta de dados automaticamente quando esse tempo for atingido. Clique em “Preview” para ver os resultados.
12. Análise da Amostra Utilizando a Estação de Trabalho OffLine. Abra a “OffLine Chromatostation” e carregue o método (*.MTD) apropriado. Abra um arquivo de cromatograma a ser processado. Clique em “Preview” para visualizar os resultados.
    Nota: Se um método de não-normalização for selecionado, você necessita informar a massa da amostra na tabela de parâmetros de integração e a massa do padrão interno na tabela de componentes.

7.2. Exemplos: Como Utilizar os Métodos de Calibração

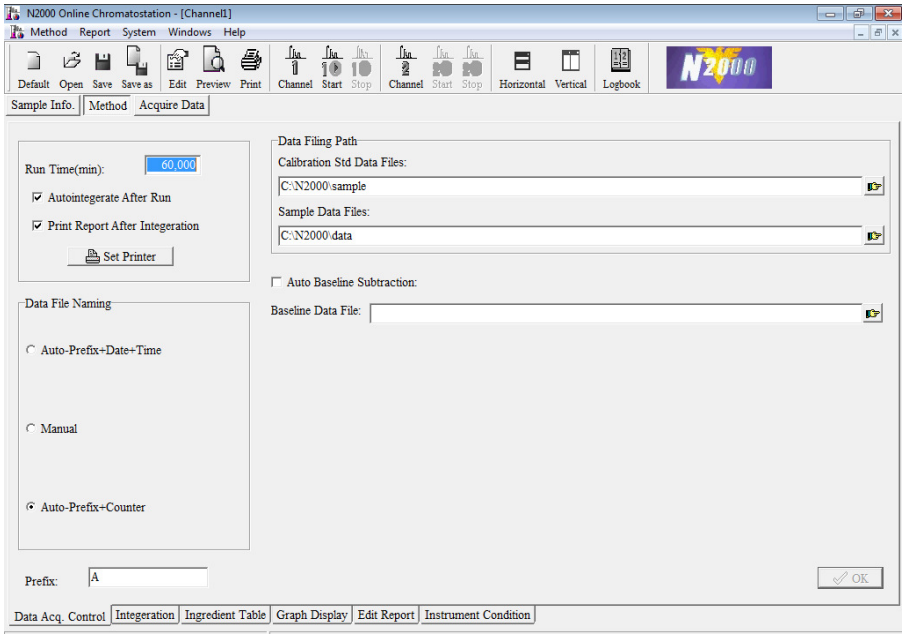
7.2.1. Calibração por Padrão Externo (Ponto Único – Calibração Múltipla)

Há quatro componentes neste exemplo, com seus respectivos valores de concentração, como segue:

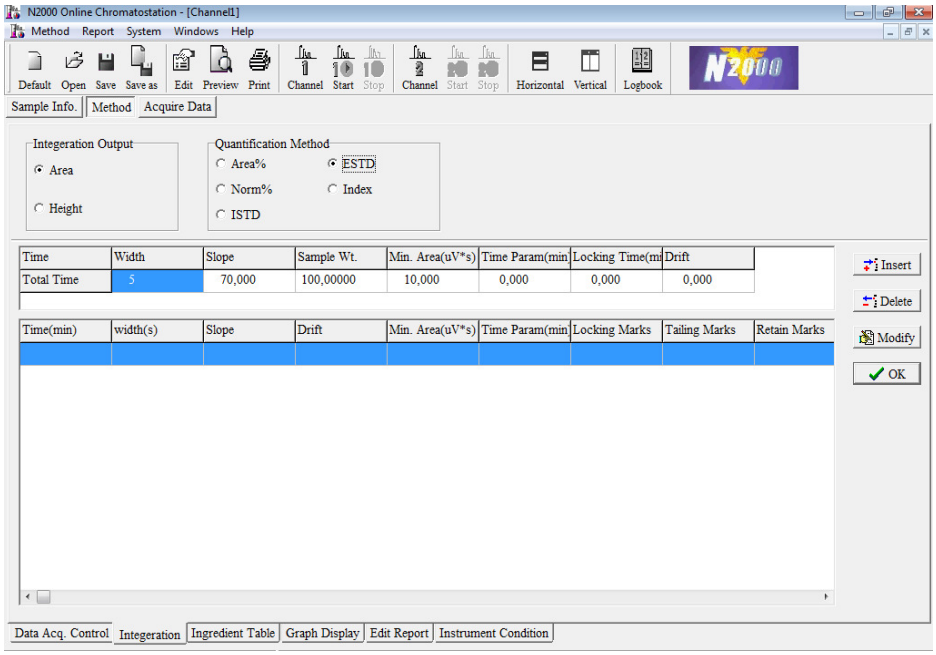
Componente	Concentração
A	25,23
B	45,22
C	15,5
D	14,0

O método de quantificação escolhido para esta amostra é “Calibração Por Padrão Externo Por Média de Calibrador Baseado em Área”. Os arquivos de dados para duas injeções repetidas foram salvos como hplc-1.dat e hplc-2.dat, na pasta C:\N2000\demoDat\, no seu HD. Agora, vamos demonstrar como proceder a uma calibração por normalização com ponto único e duas calibrações.

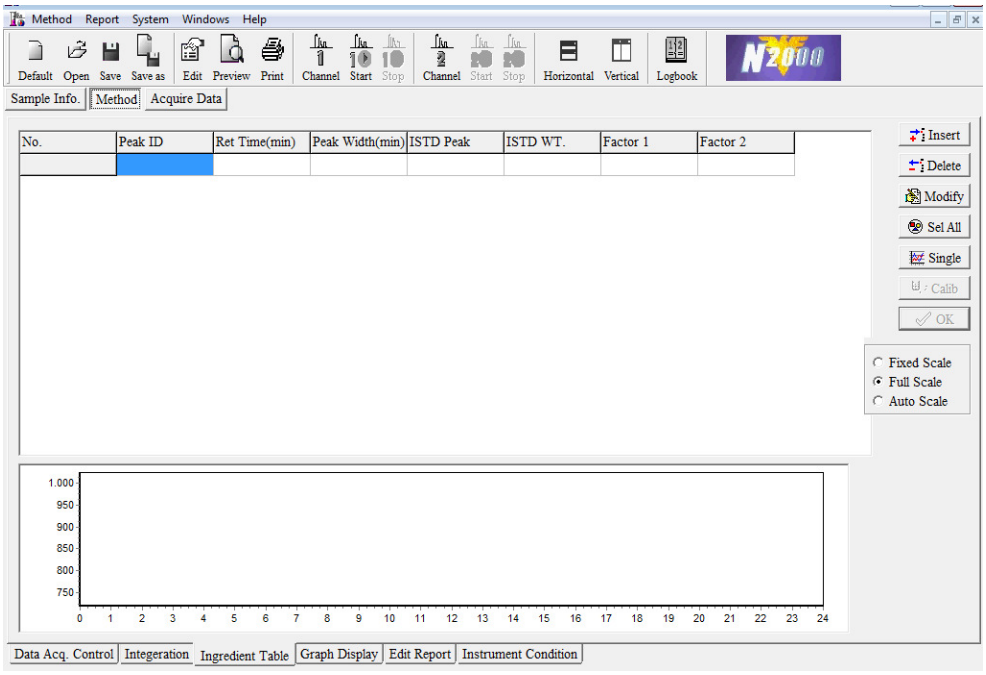
1. Abra a Estação de Trabalho OnLine e selecione o canal apropriado.
2. Clique em “Method” para definir o Controle de Aquisição de Dados.



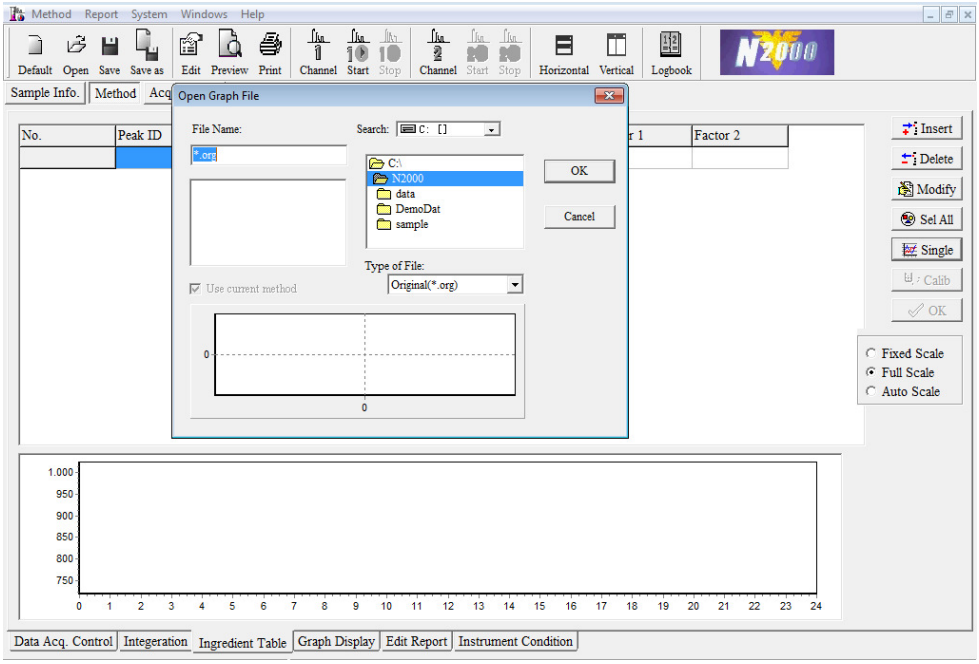
3. Clique em “Integration” na página “Method”. Selecione os boxes apropriados para saída de integração e método de quantificação. Neste exemplo, nós escolhemos “Area” e “ESTD”, respectivamente.


N2000 Online Chromatostation - [Channel1]
Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
Sample Info. Method Acquire Data
Integeration Output
Area
Height
Quantification Method
Area%
ESTD
Norm%
Index
ISTD
Time Width Slope Sample Wt. Min. Area(uV*s) Time Param(min Locking Time(mi Drift
Total Time 5 70,000 100,00000 10,000 0,000 0,000 0,000
Time(min) width(s) Slope Drift Min. Area(uV*s) Time Param(min Locking Marks Tailing Marks Retain Marks
Insert
Delete
Modify
OK
Data Acq. Control Integeration Ingredient Table Graph Display Edit Report Instrument Condition

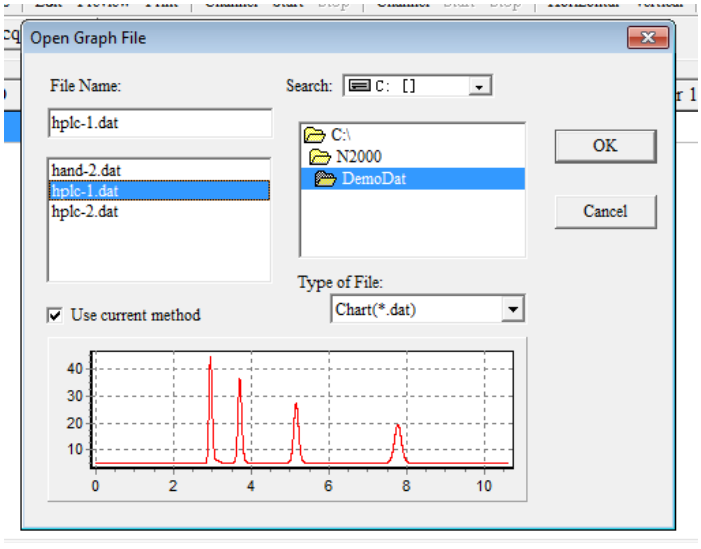
4. Clique em “Ingredient Table” na parte de baixo da janela “Method” e uma nova janela será exibida.


Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
Sample Info. Method Acquire Data
No. Peak ID Ret Time(min) Peak Width(min) ISTD Peak ISTD WT. Factor 1 Factor 2
Insert
Delete
Modify
Sel All
Single
Calib
OK
Fixed Scale
Full Scale
Auto Scale
1.000
950
900
850
800
750
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
Data Acq. Control Integeration Ingredient Table Graph Display Edit Report Instrument Condition

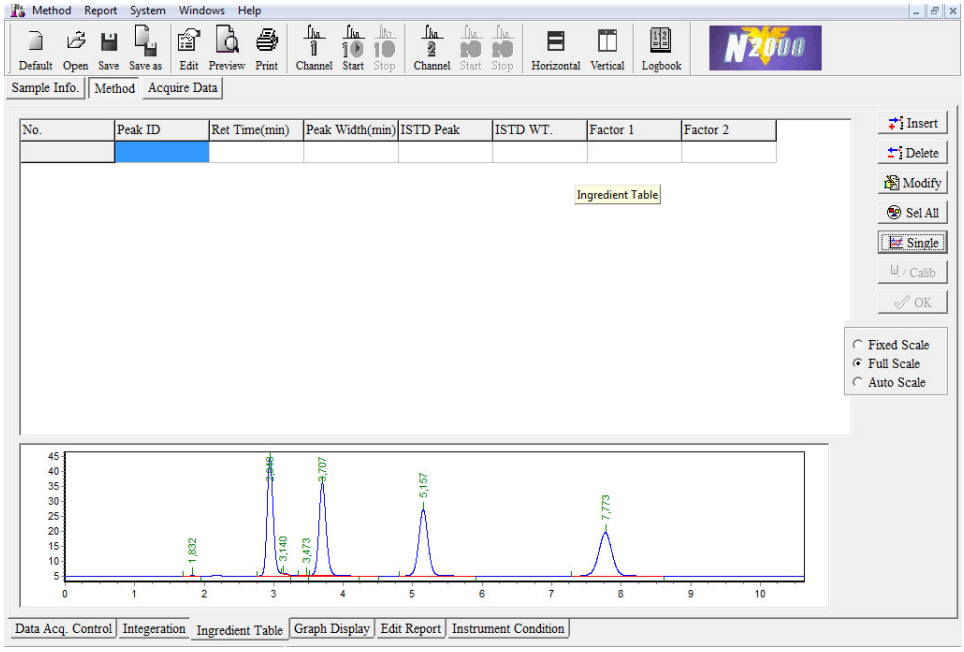
Clique no botão “Single” (que, na realidade deveria ter sido grafado com “Signal”) na barra direita para ativar a janela de diálogo “Open Graph File”.



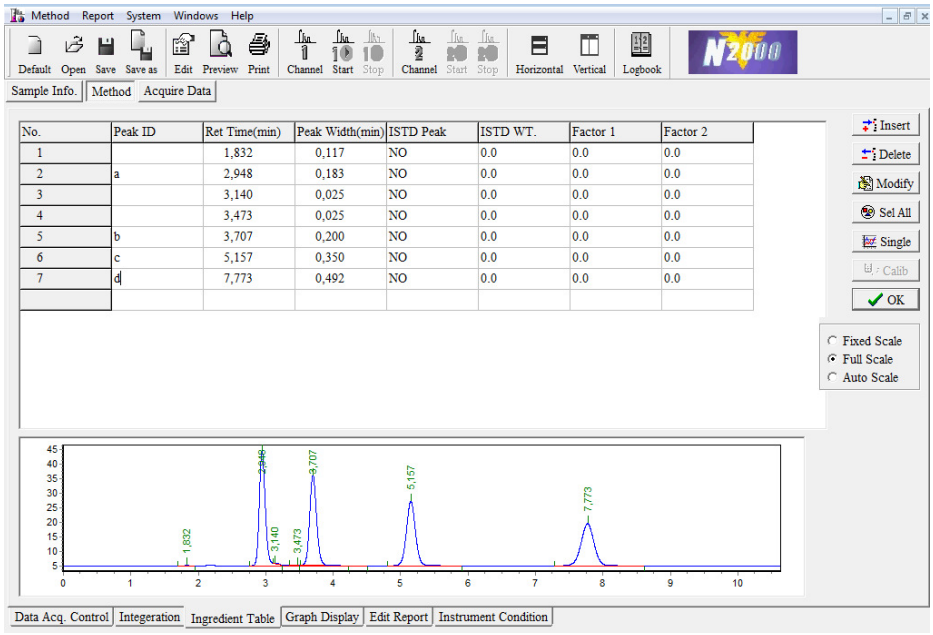
Selecione o arquivo de dados a partir da pasta apropriada.



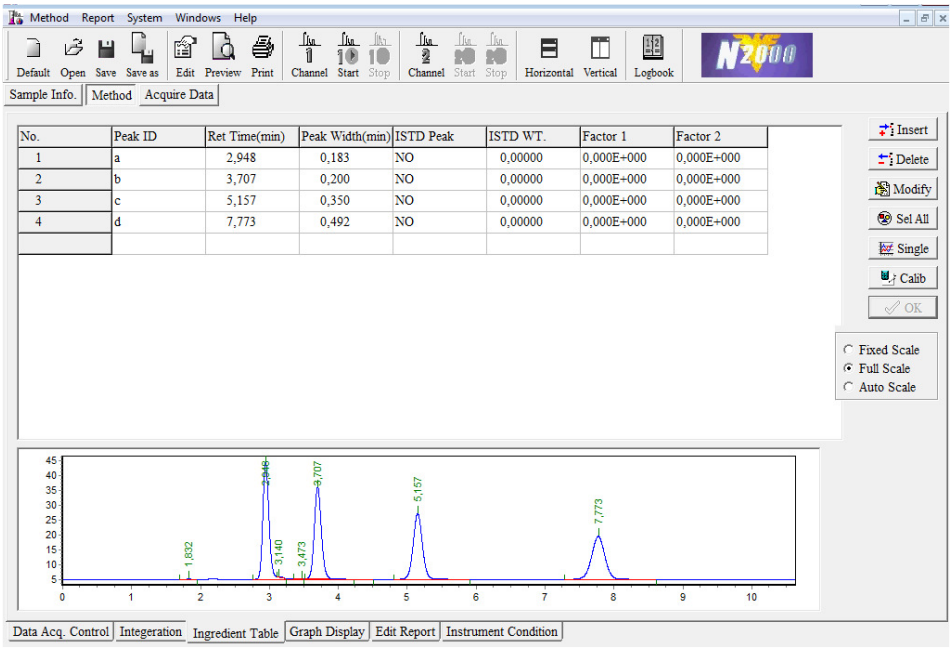
Clique em “OK” para abrir o cromatograma do padrão.


Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
Sample Info. Method Acquire Data
No. Peak ID Ret Time(min) Peak Width(min) ISTD Peak ISTD WT. Factor 1 Factor 2
Ingredient Table
Insert Delete Modify Sel All Single Calib OK
Fixed Scale Full Scale Auto Scale
1,832 2,948 3,140 3,473 3,707 5,157 7,773
Data Acq. Control Integeration Ingredient Table Graph Display Edit Report Instrument Condition

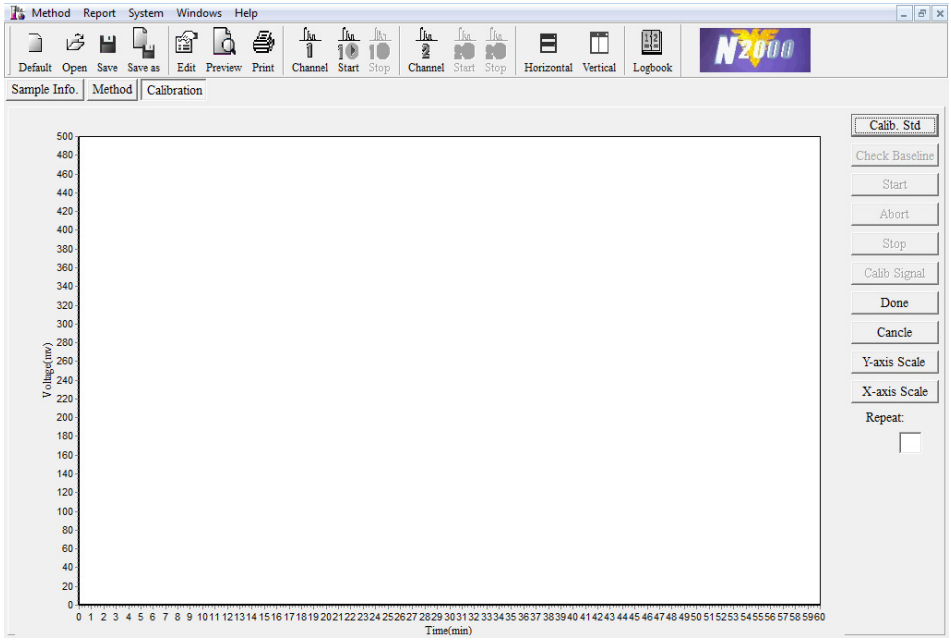
Insira os valores de tempo de retenção na Tabela de Ingredientes, seja utilizando o botão “Insert” ou o botão “Select All” na barra direita. Neste exemplo, nós clicamos em “Select All” para inserir os tempos de retenção e larguras de pico para cada um dos respectivos componentes. Digite “A”, “B”, “C” e “D”, na coluna “Peak ID”, nas linhas correspondentes aos respectivos picos.


Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
Sample Info. Method Acquire Data
No. Peak ID Ret Time(min) Peak Width(min) ISTD Peak ISTD WT. Factor 1 Factor 2
1 1,832 0,117 NO 0.0 0.0 0.0
2 a 2,948 0,183 NO 0.0 0.0 0.0
3 3,140 0,025 NO 0.0 0.0 0.0
4 3,473 0,025 NO 0.0 0.0 0.0
5 b 3,707 0,200 NO 0.0 0.0 0.0
6 c 5,157 0,350 NO 0.0 0.0 0.0
7 d 7,773 0,492 NO 0.0 0.0 0.0
Insert Delete Modify Sel All Single Calib OK
Fixed Scale Full Scale Auto Scale
1,832 2,948 3,140 3,473 3,707 5,157 7,773
Data Acq. Control Integeration Ingredient Table Graph Display Edit Report Instrument Condition

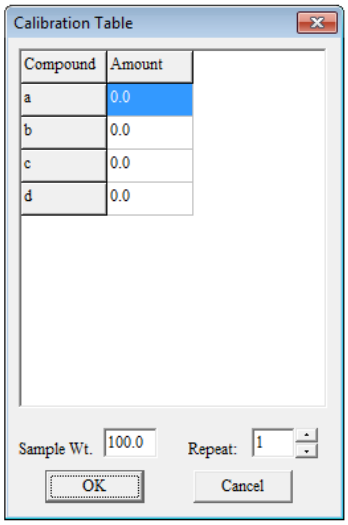
Elimine os “.” Nas colunas onde houver os valores “0.0”. Clique em “OK” para confirmar os dados. Uma nova janela será aberta para indicar os dados que forem aceitos.


Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
N2000
Sample Info. Method Acquire Data
No. Peak ID Ret Time(min) Peak Width(min) ISTD Peak ISTD WT. Factor 1 Factor 2
1 a 2,948 0,183 NO 0,00000 0,000E+000 0,000E+000
2 b 3,707 0,200 NO 0,00000 0,000E+000 0,000E+000
3 c 5,157 0,350 NO 0,00000 0,000E+000 0,000E+000
4 d 7,773 0,492 NO 0,00000 0,000E+000 0,000E+000
Insert
Delete
Modify
Sel All
Single
Calib
OK
Fixed Scale
Full Scale
Auto Scale
1,832
3,140
3,473
2,948
3,707
5,157
7,773
Data Acq. Control Integeration Ingredient Table Graph Display Edit Report Instrument Condition

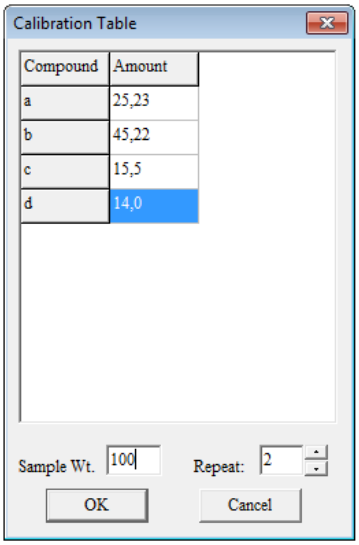
Clique em “calib” para ativar a calibração, a qual deverá estar habilitada a esta altura. Uma nova janela deverá ser exibida



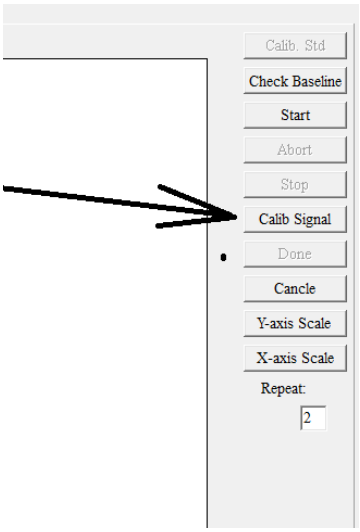
5. Clique em “Calib STD” na barra da direita para abrir um janela de diálogo.



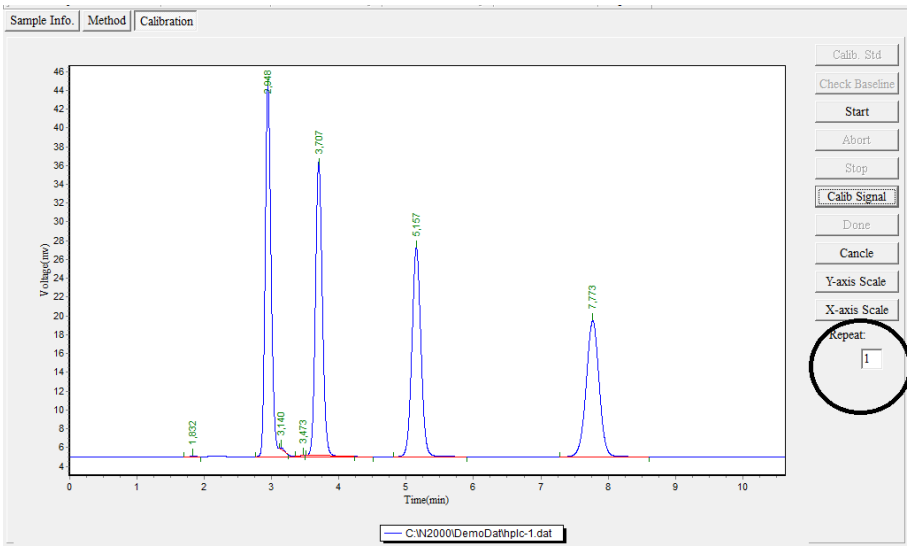
Digite as concentrações de cada um dos quatro componentes. Digite 100,0 ou 100 para a massa ou volume da amostra, na caixa “Sample Wt” e selecione o número de repetições para 2 clicando no botão seta para cima na caixa “Repeat”. Clique em OK para gravar os dados.



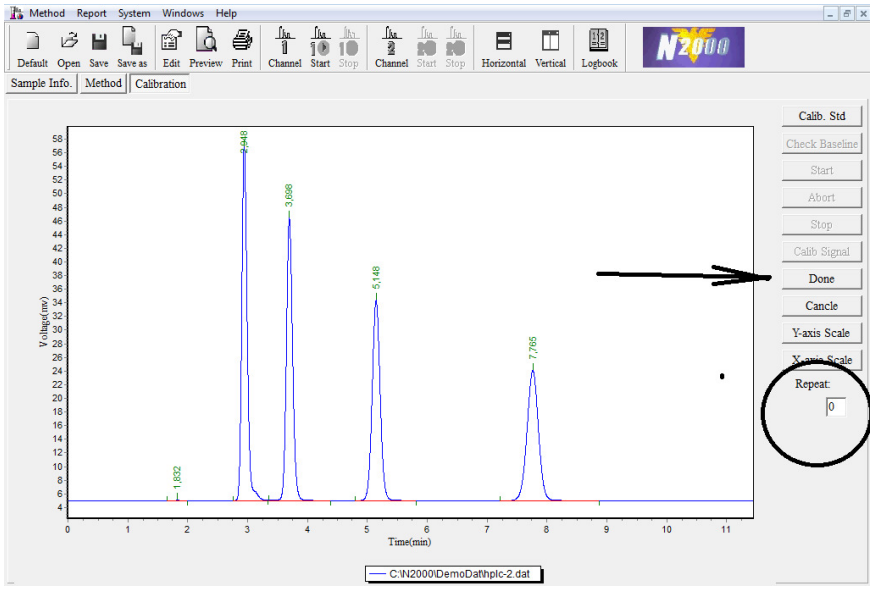
O botão “Calib Signal” estará habilitado.



Clique em “Calib Signal” para selecionar o arquivo de dados hplc-1.dat novamente e o número na caixa de repetições diminuirá para “1”.

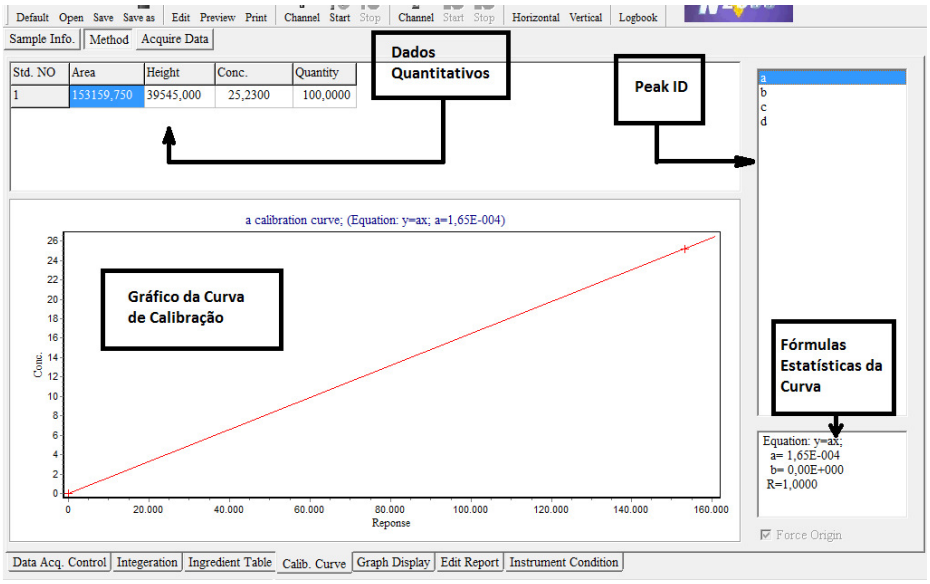


Repita o último procedimento, utilizando o arquivo de dados hplc-2.dat e o número na caixa de repetições cairá para “0” e o botão “Done” será habilitado.



Nota: Caso o botão "Done" não seja habilitado durante a calibração, será, provavelmente, devido ao fato de que o tempo de retenção de pelo menos um componente tenha caído fora da faixa de tempo inserida na tabela de componentes. Isto poderá ser corrigido modificando o tempo de retenção ou a faixa de tempo na tabela de componentes.

6. Clique em "Done" para apresentar uma nova janela para as curvas de calibração. Clique no respectivo Peak ID localizado na caixa que está no canto superior direito da janela para visualizar os dados quantitativos, as fórmulas da curva e o gráfico da curva de calibração.



Clique em “Save as” e nomeie o arquivo como “Calibração por Padrão Externo. Mtd”, para salvar a curva de calibração para uso posterior.

7. Injete a amostra

   Proceda à injeção da amostra a ser analisada. Clique em “Stop” quando todos os picos tiverem eluído. Clique em “Preview” para visualizar os resultados.
   Nota: quando um método de calibração por normalização é utilizado para a análise de amostras, não é necessário inserir a massa da amostra (os dados padrão são utilizados no lugar). Se o total não for 100% para a calibração normalizada baseada em área, um valor de proporcionalidade será digitado na caixa “Sample Weight”. Por exemplo, se há 12% dos componentes que não são detectados (ou não são eluídos) o total dos componentes eluídos será de 88%. Neste caso, o parâmetro para a massa de amostra será inserido com o valor 88.

7.2.2. Calibração por Padrão Interno por Área / Altura (Ponto Único / Dupla Calibração)

Preparação da solução padrão VE: pesar precisamente 98,54 mg de padrão VE (99,3% de pureza) e transferir para um balão volumétrico de 100 ml contendo uma solução de C32 a 1,0 mg/ml como padrão interno, em n-Hexano. A concentração do padrão é 0,9785 mg/ml VE. Completar o volume, após a dissolução total do padrão VE, com a solução de C32.
Preparação da amostra #1 do VE: pesar precisamente 96,13 mg da amostra e transferir para um balão volumétrico de 100 ml contendo uma solução de C32 a 1,0 mg/ml dissolvido em n-Hexano. Dissolver a amostra e completar o volume com a solução de C32. A concentração da amostra é 0,9613 mg/ml de amostra.
Preparação da amostra #2 do VE: pesar precisamente 90,10 mg da amostra e transferir para um balão volumétrico de 100 ml contendo uma solução de C32 a 1,0 mg/ml dissolvido em n-Hexano. Dissolver a amostra e completar o volume com a solução de C32. A concentração da amostra é 0,9010 mg/ml de amostra.

Concentração de componentes da solução padrão:

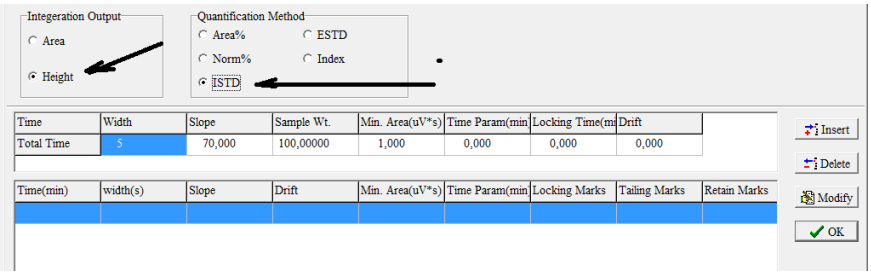
Componente	Massa (mg)	Concentração (mg/ml)	Pureza (5)	Massa Corrigida (mg)
NB (C32)	1*100=100	1	100	100
VE	98,54	0,9785	99,3	97,85

Concentrações das amostras a serem determinadas:

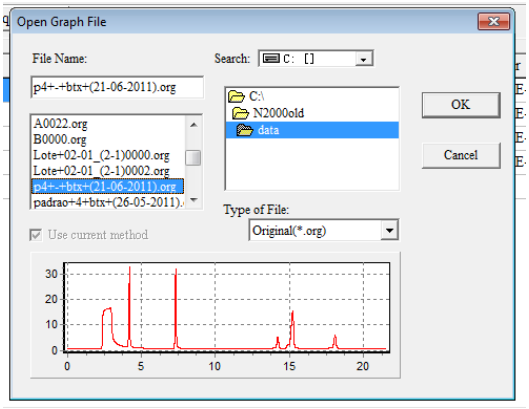
Amostra #	Componente	Massa (mg)	Concentração (mg/ml)	Pureza (%)	Massa Corrigida (mg)
1	NB (C32)	1*100=100	1	100	100
	VE	96,13	0,9613*X1	X1	Y1
2	NB (C32)	1*100=100	1	100	100
	VE	90,10	0,9010*X2	X2	Y2

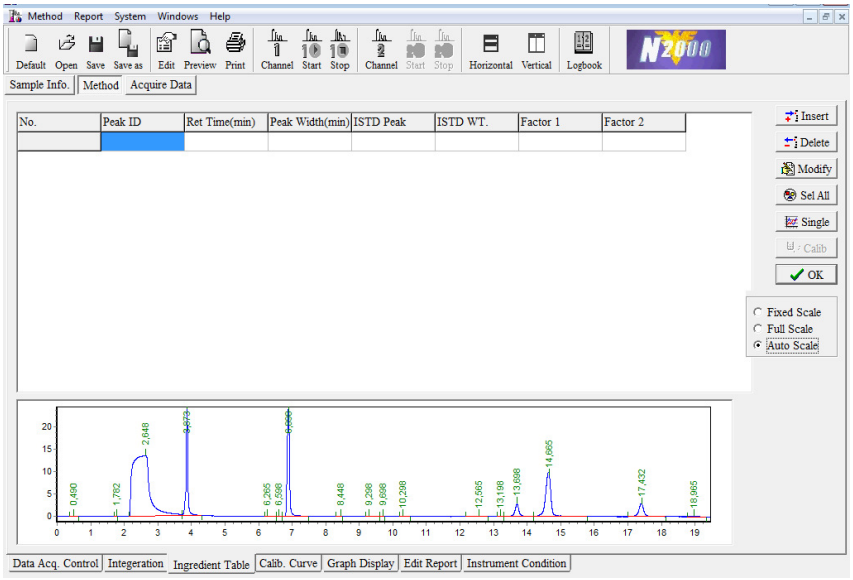
O método de quantificação utilizado para esta amostra será o de Padrão Interno Baseado na Altura dos Picos. Duas injeções de repetição serão feitas com o padrão VE e os arquivos de dados correspondentes serão salvos como VE Standard #1.dat e VE Standard #2.dat. O método é calibrado duas vezes utilizando apenas um componente, em ponto único para obter uma média de calibrador.

O procedimento é o seguinte:

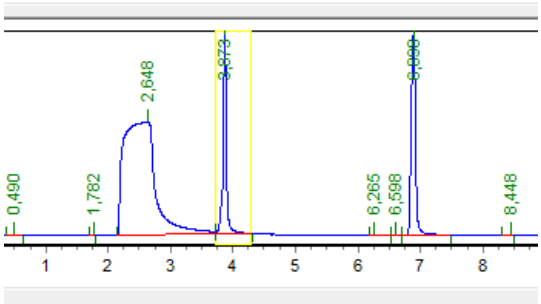
1. Abra a Estação de Trabalho OnLine e selecione o canal apropriado.
2. Vá para a página "Method" e clique em "Integration" na base da janela para selecionar o método de integração. Neste exemplo, clique em "Height" e em "ISTD".
3. 

4. Clique na Tabela de Ingredientes, na barra inferior e uma nova janela será selecionada. Clique em "Single" e selecione o arquivo de dados de cromatograma a ser processado, isto é, VE Standard #1.dat. Clique em "OK" para carregar o cromatograma.
   O Cromatograma será exibido como abaixo:
   (nota: o cromatograma aqui utilizado foi obtido com componentes diferentes e está sendo usado apenas como demonstrativo)

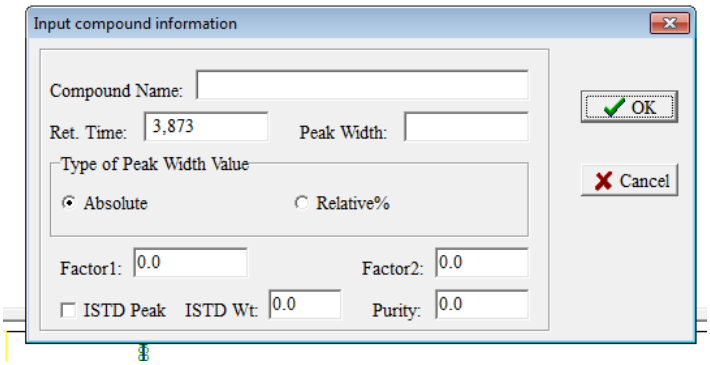


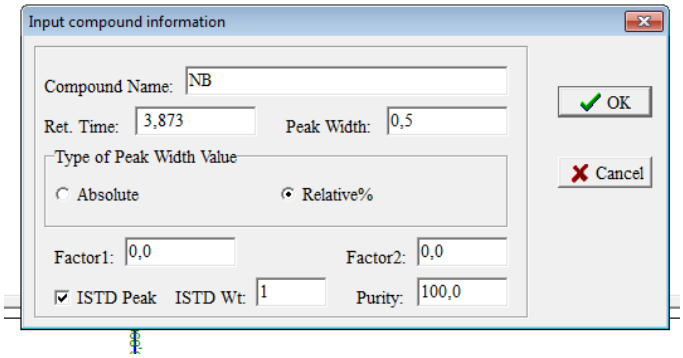

Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
Sample Info. Method Acquire Data
No. Peak ID Ret Time(min) Peak Width(min) ISTD Peak ISTD WT. Factor 1 Factor 2
Insert
Delete
Modify
Sel All
Single
Calib
OK
Fixed Scale
Full Scale
Auto Scale
Data Acq. Control Integeration Ingredient Table Calib. Curve Graph Display Edit Report Instrument Condition

Clique em “Autoscale” para deixar os picos de interesse em escala cheia. O botão “Insert” é utilizado para inserir os tempos de retenção e larguras de pico para cada um dos componentes. Primeiramente, segurando a tecla “Shift”, posicione o cursor sobre o pico a ser analisado e clique no botão esquerdo do mouse. O pico marcado será marcado com uma moldura amarela.



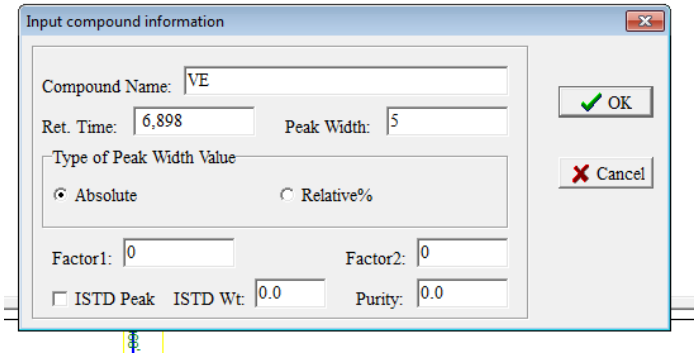
5. Clique no botão “Insert” na barra direita da janela, para o NB (padrão Interno). Uma janela de diálogo será aberta:



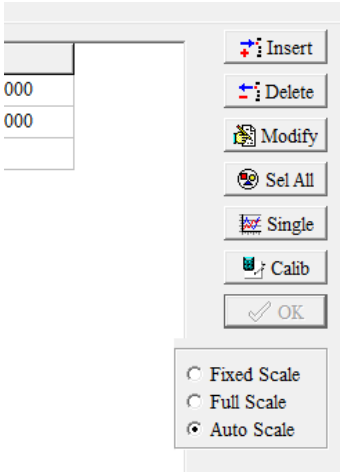


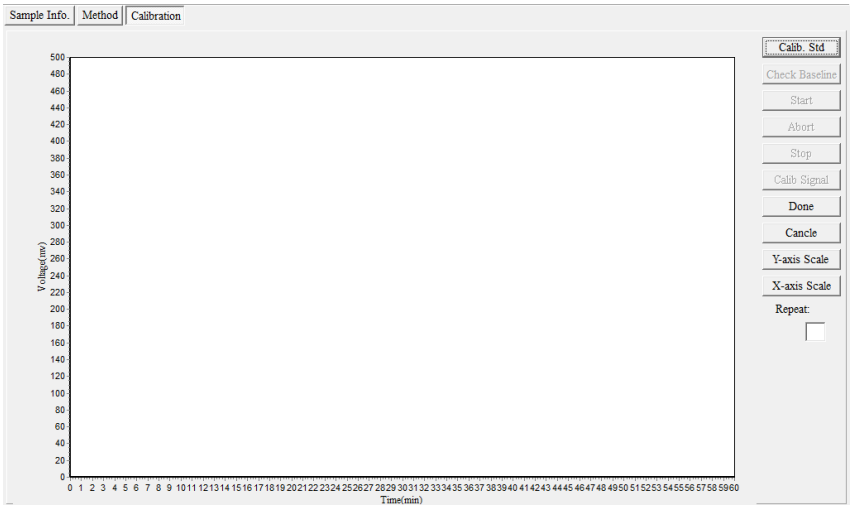
Digite “NB” na caixa “Compound Name”. Selecione a opção “Relative%” e a caixa “ISTD”. Elimine os “.” ou substitua-os por “,” nas caixas Factor 1 e Factor 2. Digite “1” na caixa “ISTD Weight” e “100” na caixa “Purity”. Note que a largura de pico pode ser apenas um valor absoluto ou 0,5 (MIN).

6. Repita o procedimento para o pico do VE. Elimine os “.” Das caixas “Factor 1” e “Factor 2”. Marque a caixa ISTD, elimine os “.” Das caixas “ISTD Weight” e “Purity” e depois disso, deixe a caixa “ISTD” desmarcada e não registre valores nas caixas “ISTD Weight” e “Purity” para os picos de amostras.

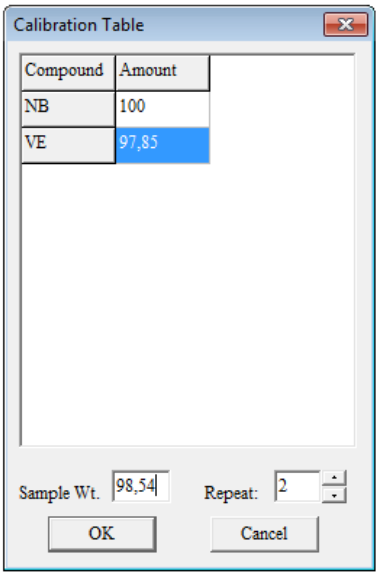


7. Clique em “OK” e o botão “Calib” será habilitado. Clique no Botão “Calib para abrir a janela de Calibração.

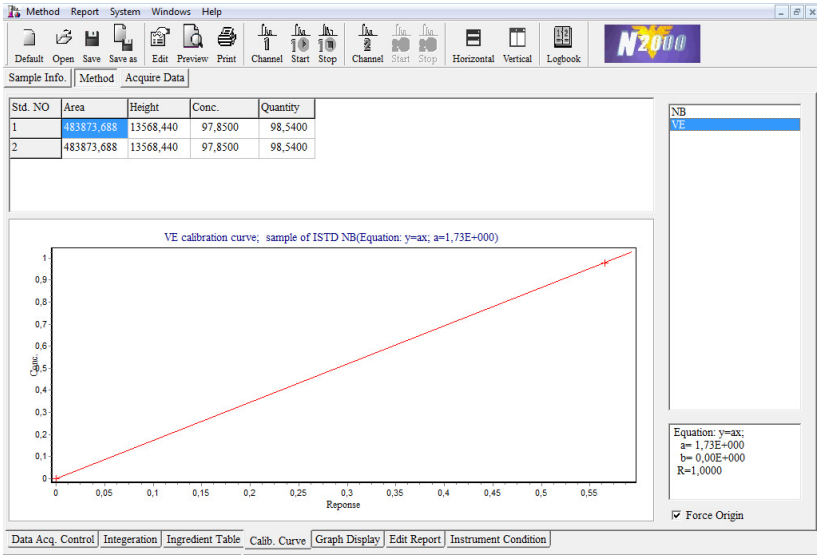




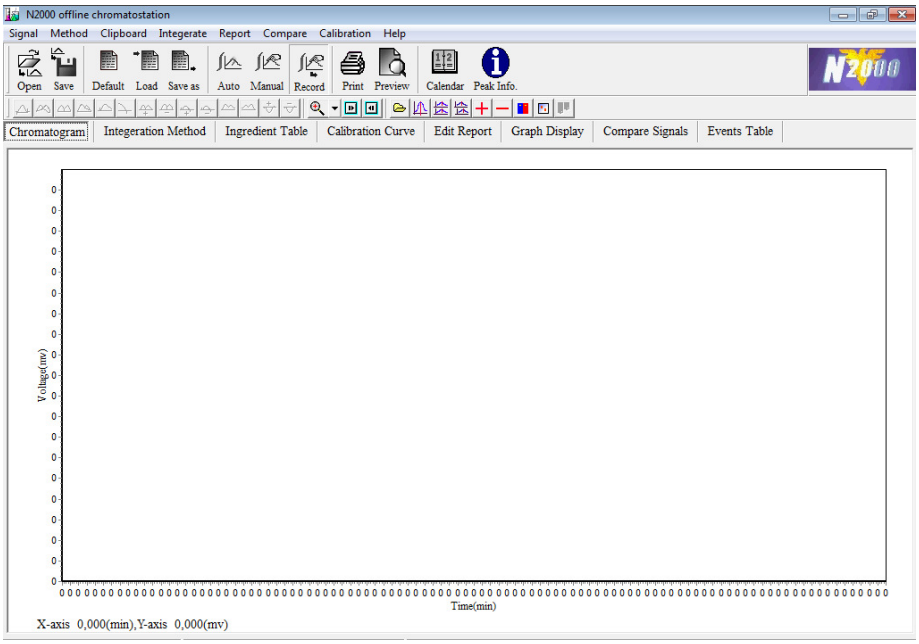
8. Clique em “Calib Std” e uma nova janela será aberta. Insira as concentrações para o NB e o VE na tabela de componentes. Digite o valor 98,54 na caixa “Sample Wt” e programe 2 na caixa “Repeat”. Clique em “OK” para gravar as informações.



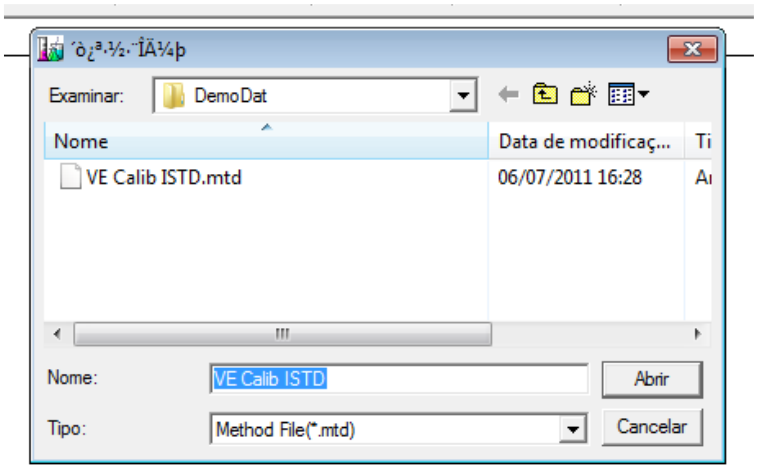
9. Calibração. Clique em “Calib Signal” e insira o arquivo VE Standard #1.dat a partir da pasta apropriada. O valor na caixa “Repeat” será reduzido para “1”. Repita o procedimento acima para o arquivo VE Standard #2 e o valor na caixa “Repeat” será reduzido para “0” e o botão “Done” será habilitado.
   Nota: Caso o botão “Done” não seja habilitado durante a calibração, será, provavelmente, devido ao fato de que o tempo de retenção de pelo menos um componente tenha caído fora da faixa de tempo inserida na tabela de componentes. Isto poderá ser corrigido modificando o tempo de retenção ou a faixa de tempo na tabela de componentes.
10. Clique em “Done” para visualizar os resultados. Clique em VE para ver a curva de calibração do VE.



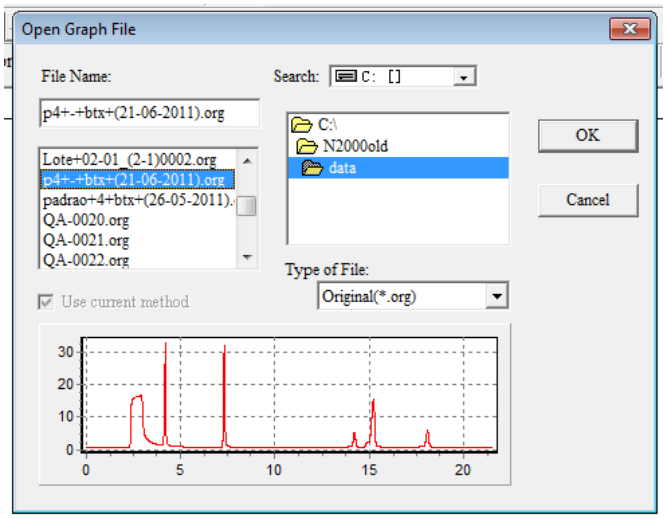
11. Clique em “Save as” e nomeie como “Height ISTD for VE 1.MTD” para salvar a curva de calibração para uso posterior.
12. Aplique a curva de calibração para a amostra do VE. Proceda à injeção das amostras e salve os arquivos de dados como VE Sample#1 e VE Sample #2 na pasta DemoDat. Abra a Estação de Trabalho OffLine.


N2000 offline chromatostation
Signal Method Clipboard Integerate Report Compare Calibration Help
Open Save Default Load Save as Auto Manual Record Print Preview Calendar Peak Info.
Chromatogram Integeration Method Ingredient Table Calibration Curve Edit Report Graph Display Compare Signals Events Table
Voltage(mv)
Time(min)
X-axis 0,000(min),Y-axis 0,000(mv)

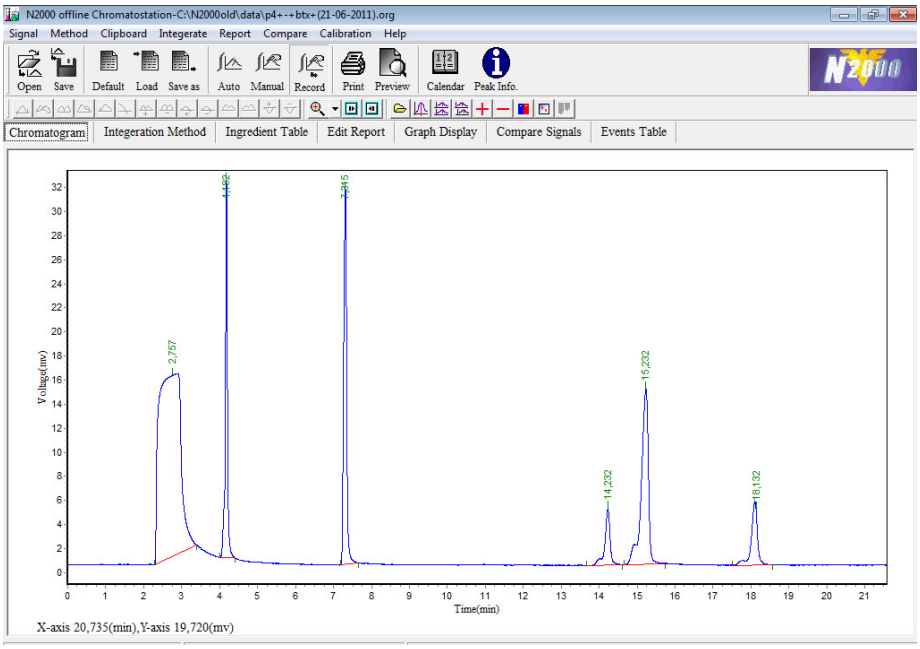
Carregue o arquivo de método da pasta apropriada.



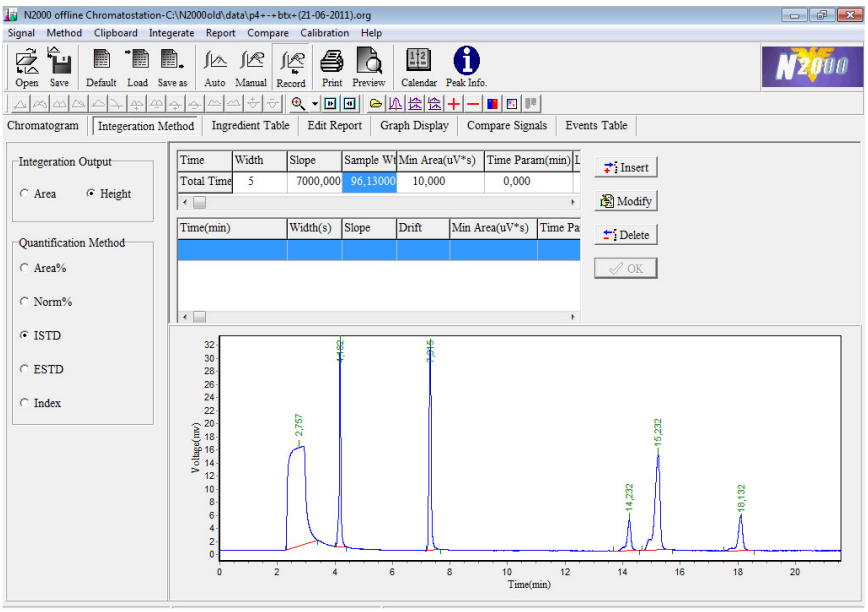
Abra o arquivo de dados do cromatograma a ser processado



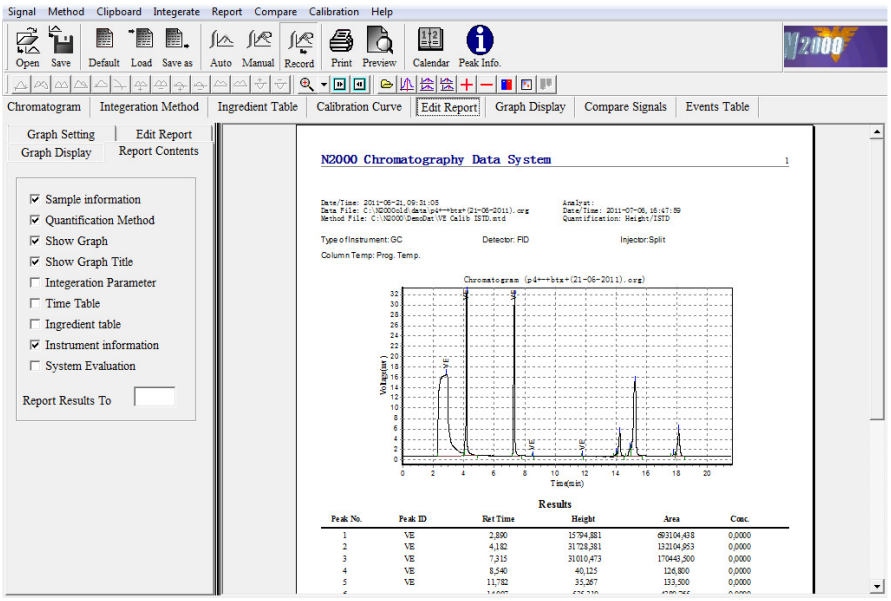
Após Clicar “OK”, o cromatograma selecionado irá aparecer na tela.


N2000 offline Chromatostation-C:\N2000old\data\p4+-+btx+(21-06-2011).org
Signal Method Clipboard Integerate Report Compare Calibration Help
Open Save Default Load Save as Auto Manual Record Print Preview Calendar Peak Info.
Chromatogram Integeration Method Ingredient Table Edit Report Graph Display Compare Signals Events Table
Voltage(mv)
Time(min)
2,757
14,232
15,232
18,132
X-axis 20,735(min),Y-axis 19,720(mv)

Vá para o método de integração e digite “96,13” na caixa da massa da amostra. Clique em “OK” para ativar a mudança efetuada.



Clique em “Preview” para ver os resultados


Signal Method Clipboard Integerate Report Compare Calibration Help
Open Save Default Load Save as Auto Manual Record Print Preview Calendar Peak Info.
Chromatogram Integeration Method Ingredient Table Calibration Curve Edit Report Graph Display Compare Signals Events Table
Graph Setting Edit Report
Graph Display Report Contents
Sample information
Quantification Method
Show Graph
Show Graph Title
Integeration Parameter
Time Table
Ingredient table
Instrument information
System Evaluation
Report Results To
N2000 Chromatography Data System
Results
Peak No. Peak ID Ret Time Height Area Conc.

Repita o procedimento acima para a amostra VE Sample #2. Abra o arquivo VE Sample#2 e vá ao método de integração. Digite “90,10” na caixa da massa de amostra na tabela de integração e clique em “OK”. Nota: Se a massa do padrão interno adicionada na solução e a solução da amostra não são as mesmas, a quantidade exata do padrão interno deverá ser inserida na tabela de componentes quando da análise das amostras.

Clique em “Preview” para ver os resultados.

A Informação sobre amostra, informação sobre as condições do instrumento e etc. podem ser inseridas ou modificadas na estação de trabalho OnLine.

Nota: Algumas explicações sobre inserção de massa de amostra e massa de padrão interno:

1) Como inserir a massa de padrão interno (ISWT)
   O ISWT pode ser inserido na quantidade absoluta do componente interno adicionado. Durante a análise de calibração, a concentração do padrão interno na tabela de identificação é informada desta forma simplificada: ISWT = 1.
   Por exemplo: se 10 microlitros de padrão interno a 2 ng/µl são injetados, então, ISWT = 20 ng.
2) Como inserir a massa da amostra
   A massa da amostra pode ser informada como tal antes da adição do padrão interno. Em princípio, a mesma unidade utilizada para o padrão interno será utilizada para a amostra. De outra forma, o resultado será expresso em uma unidade diferente.
   Por exemplo: 2 ml de uma solução de amostra contendo 0,5 g de padrão interno, então, ISWT = 0,5g e Sample Wt = 2 ml. Assim o resultado será expresso em g/ml.

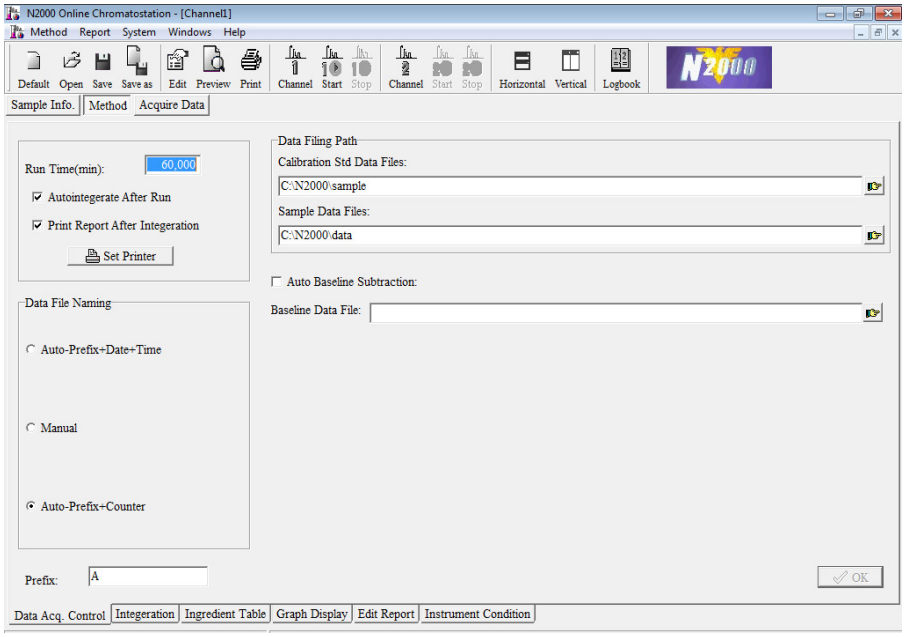
7.2.3. Normalização por Calibrador (Ponto Único – Calibração Múltipla)

Há quatro componentes neste exemplo, com seus respectivos valores de concentração, como segue:

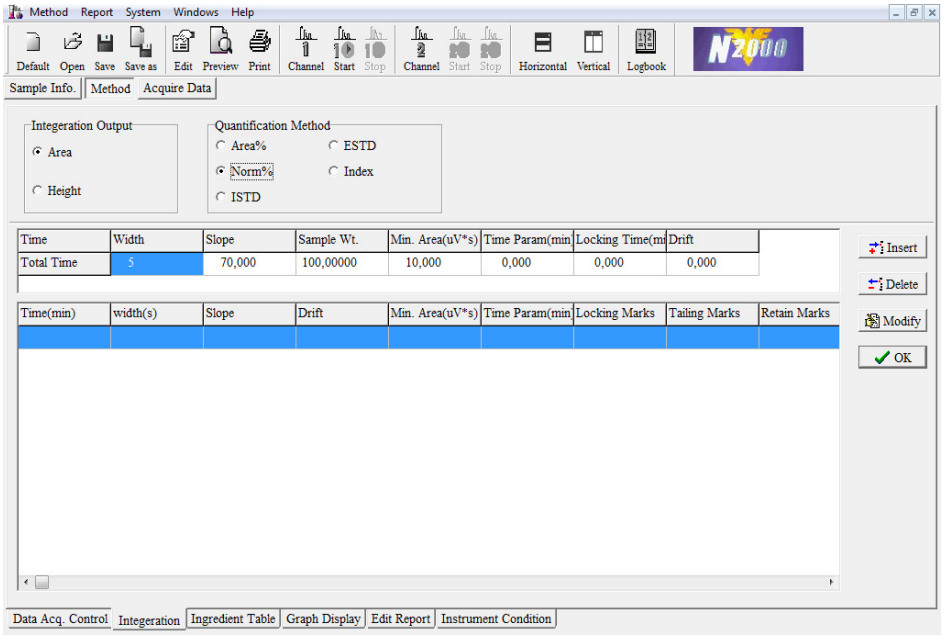
Componente	Concentração
A	25,23
B	45,22
C	15,5
D	14,0

O método de quantificação escolhido para esta amostra é “Normalização Por Média de Calibrador Baseado em Área”. Os arquivos de dados para duas injeções repetidas foram salvos como hplc-1.dat e hplc-2.dat, na pasta C:\N2000\demoDat\, no seu HD. Agora, vamos demonstrar como proceder a uma calibração por normalização com ponto único e duas calibrações.

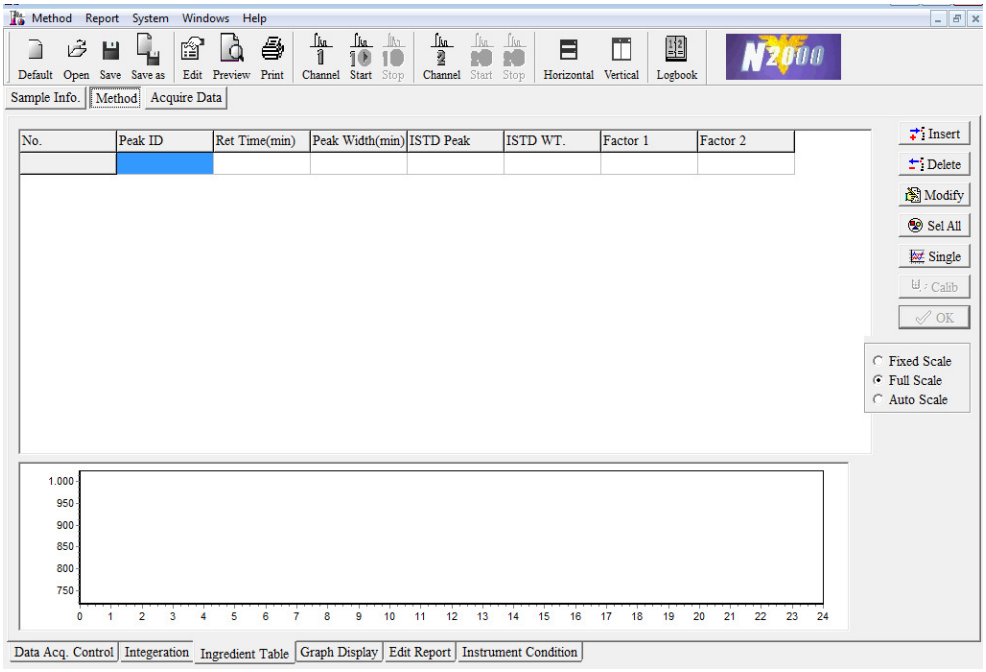
1. Abra a Estação de Trabalho OnLine e selecione o canal apropriado.
2. Clique em “Method” para definir o Controle de Aquisição de Dados.



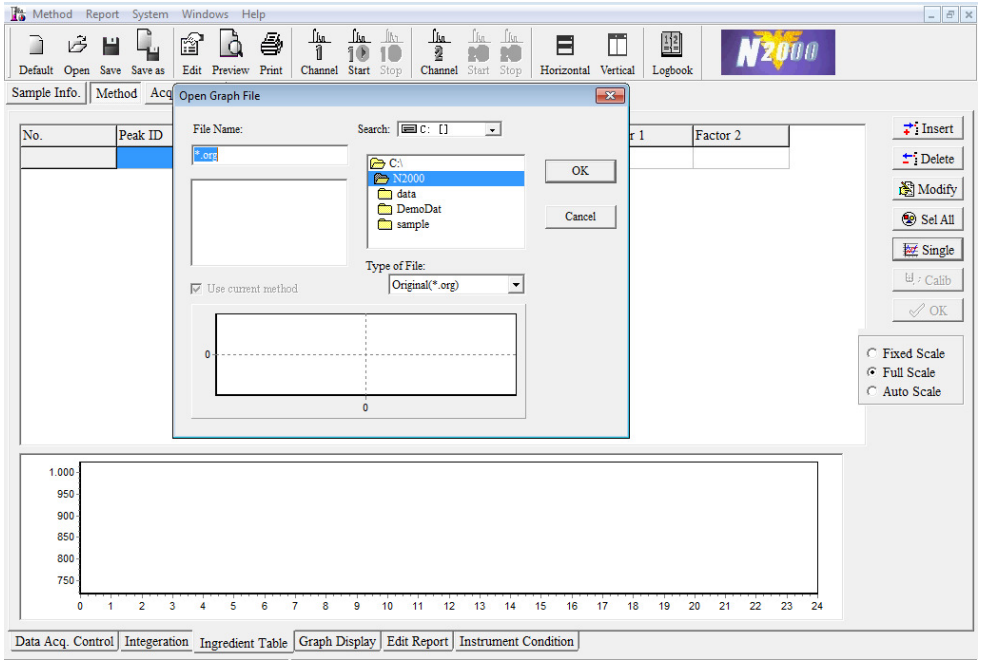
3. Clique em “Integration” na página “Method”. Selecione os boxes apropriados para saída de integração e método de quantificação. Neste exemplo, nós escolhemos “Area” e “Norm%”, respectivamente.


Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
Sample Info. Method Acquire Data
Integration Output
Area
Height
Quantification Method
Area%
ESTD
Norm%
Index
ISTD
Time Width Slope Sample Wt. Min. Area(uV*s) Time Param(min Locking Time(mi Drift
Total Time 5 70,000 100,00000 10,000 0,000 0,000 0,000
Time(min) width(s) Slope Drift Min. Area(uV*s) Time Param(min Locking Marks Tailing Marks Retain Marks
Insert
Delete
Modify
OK
Data Acq. Control Integration Ingredient Table Graph Display Edit Report Instrument Condition

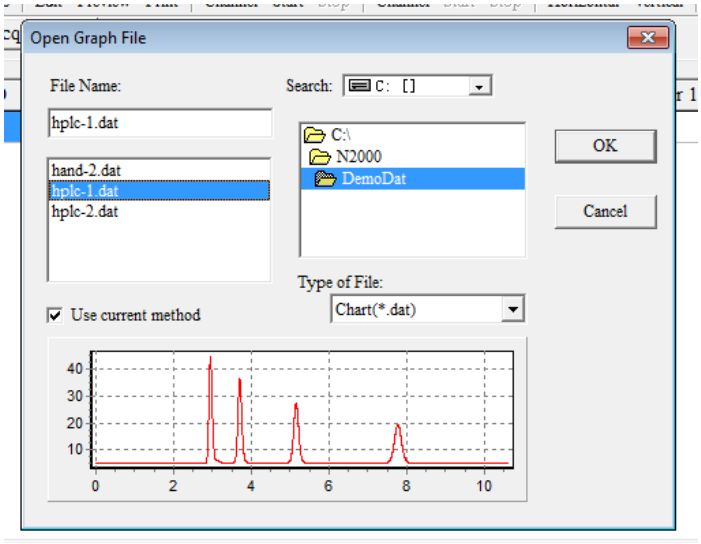
4. Clique em “Ingredient Table” na parte de baixo da janela “Method” e uma nova janela será exibida.


Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
N2000
Sample Info. Method Acquire Data
No. Peak ID Ret Time(min) Peak Width(min) ISTD Peak ISTD WT. Factor 1 Factor 2
Insert
Delete
Modify
Sel All
Single
Calib
OK
Fixed Scale
Full Scale
Auto Scale
Data Acq. Control Integeration Ingredient Table Graph Display Edit Report Instrument Condition

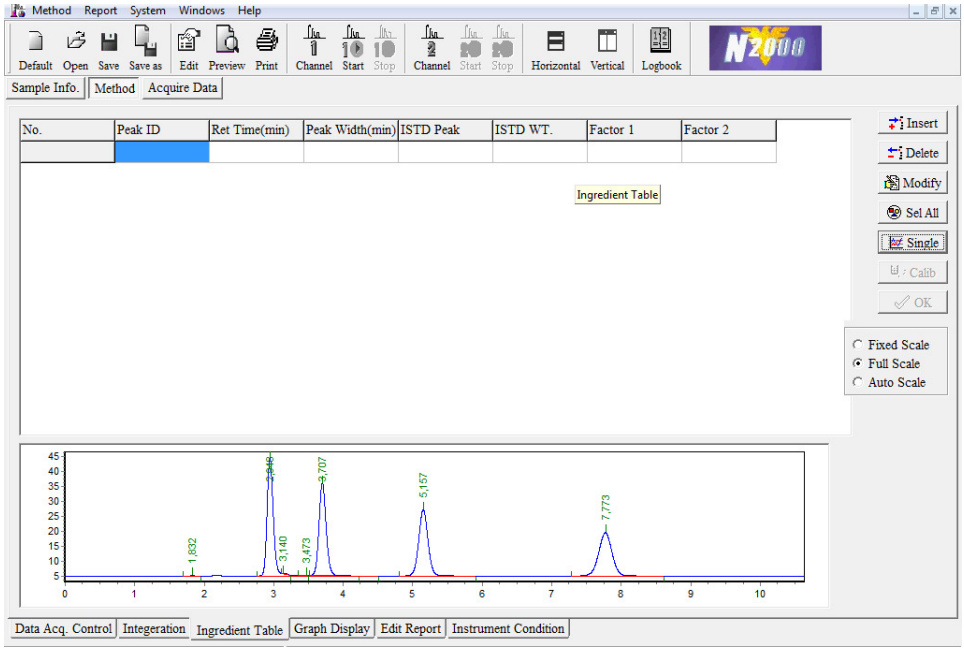
Clique no botão “Single” (que, na realidade deveria ter sido grafado com “Signal”) na barra direita para ativar a janela de diálogo “Open Graph File”.



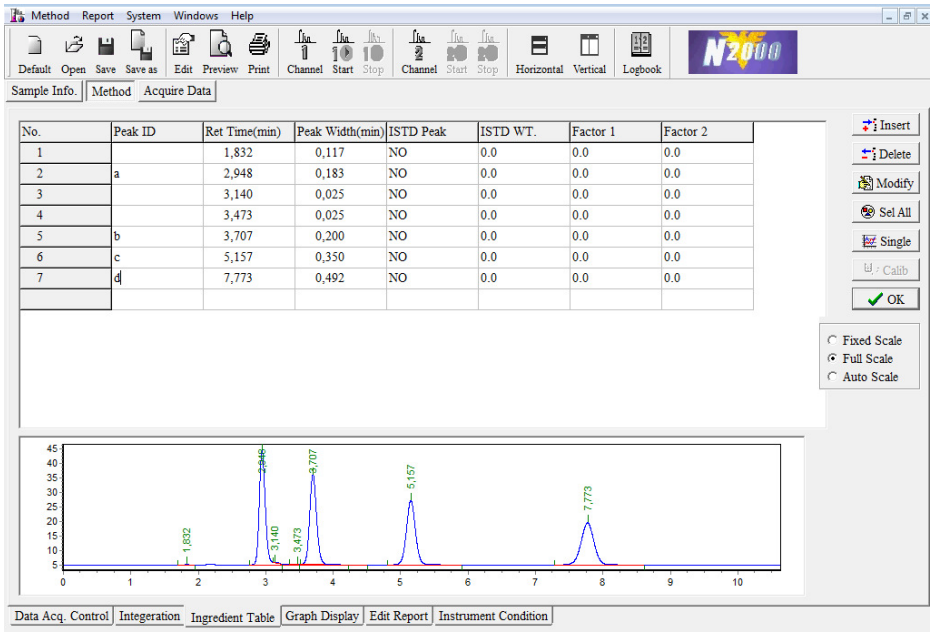
Selecione o arquivo de dados a partir da pasta apropriada.



Clique em “OK” para abrir o cromatograma do padrão.

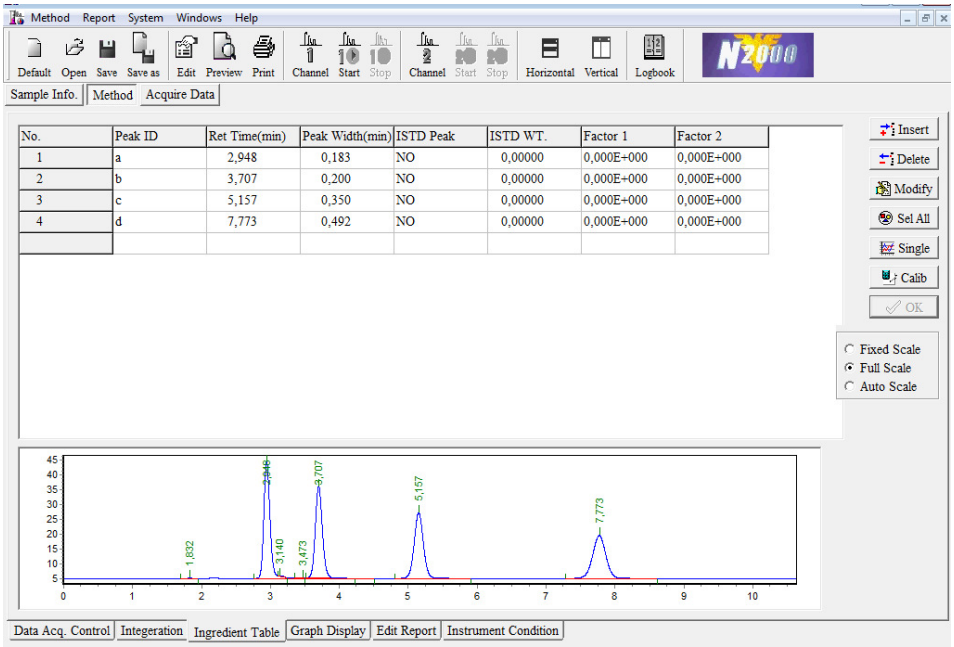


Insira os valores de tempo de retenção na Tabela de Ingredientes, seja utilizando o botão “Insert” ou o botão “Select All” na barra direita. Neste exemplo, nós clicamos em “Select All” para inserir os tempos de retenção e larguras de pico para cada um dos respectivos componentes. Digite “A”, “B”, “C” e “D”, na coluna “Peak ID”, nas linhas correspondentes aos respectivos picos.


Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
Sample Info. Method Acquire Data
Insert Delete Modify Sel All Single Calib OK
Fixed Scale Full Scale Auto Scale
Data Acq. Control Integeration Ingredient Table Graph Display Edit Report Instrument Condition

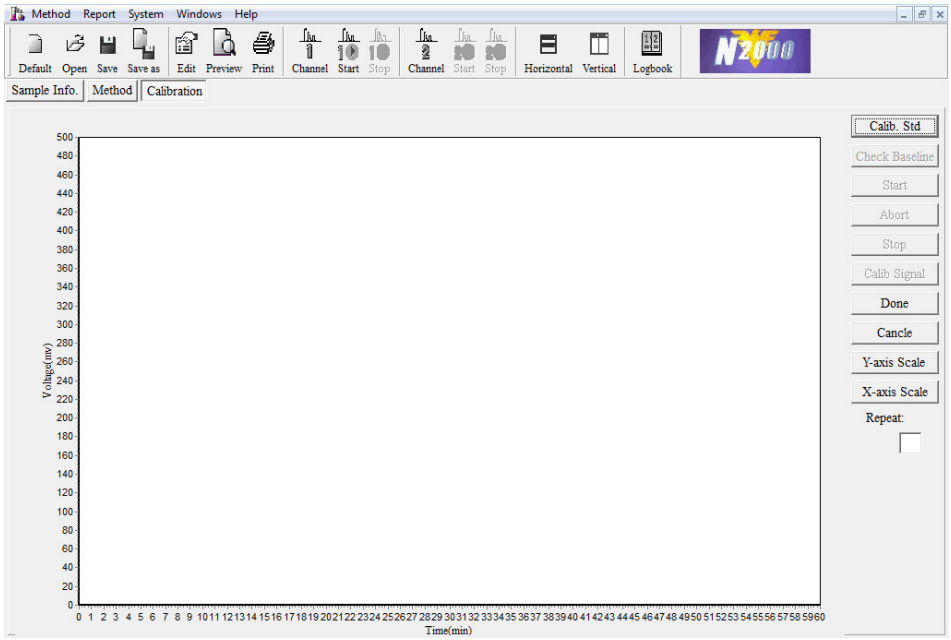
No.	Peak ID	Ret Time(min)	Peak Width(min)	ISTD Peak	ISTD WT.	Factor 1	Factor 2
1		1,832	0,117	NO	0.0	0.0	0.0
2	a	2,948	0,183	NO	0.0	0.0	0.0
3		3,140	0,025	NO	0.0	0.0	0.0
4		3,473	0,025	NO	0.0	0.0	0.0
5	b	3,707	0,200	NO	0.0	0.0	0.0
6	c	5,157	0,350	NO	0.0	0.0	0.0
7	d	7,773	0,492	NO	0.0	0.0	0.0

Elimine os "." Nas colunas onde houver os valores "0.0". Clique em "OK" para confirmar os dados. Uma nova janela será aberta para indicar os dados que forem aceitos.

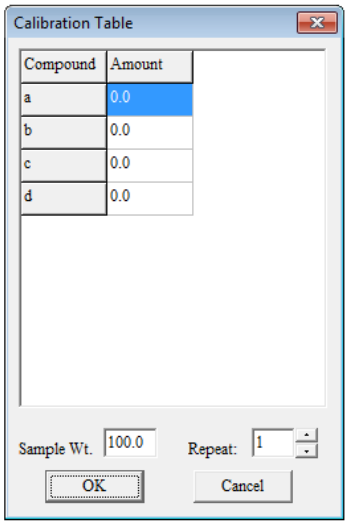

Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
Sample Info. Method Acquire Data
Insert Delete Modify Sel All Single Calib OK
Fixed Scale Full Scale Auto Scale
Data Acq. Control Integeration Ingredient Table Graph Display Edit Report Instrument Condition

No.	Peak ID	Ret Time(min)	Peak Width(min)	ISTD Peak	ISTD WT.	Factor 1	Factor 2
1	a	2,948	0,183	NO	0,00000	0,000E+000	0,000E+000
2	b	3,707	0,200	NO	0,00000	0,000E+000	0,000E+000
3	c	5,157	0,350	NO	0,00000	0,000E+000	0,000E+000
4	d	7,773	0,492	NO	0,00000	0,000E+000	0,000E+000

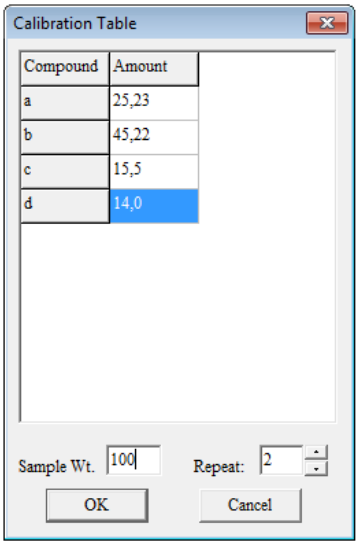
Clique em "calib" para ativar a calibração, a qual deverá estar habilitada a esta altura. Uma nova janela deverá ser exibida



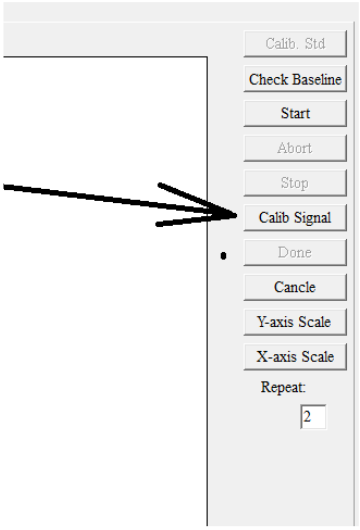
5. Clique em “Calib STD” na barra da direita para abrir um janela de diálogo.



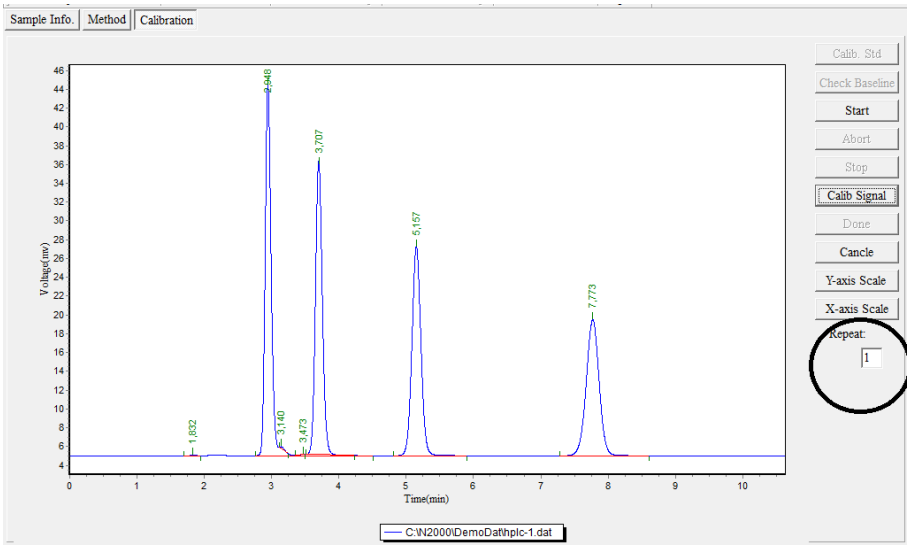
Digite as concentrações de cada um dos quatro componentes. Digite 100,0 ou 100 para a massa ou volume da amostra, na caixa “Sample Wt” e selecione o número de repetições para 2 clicando no botão seta para cima na caixa “Repeat”. Clique em OK para gravar os dados.



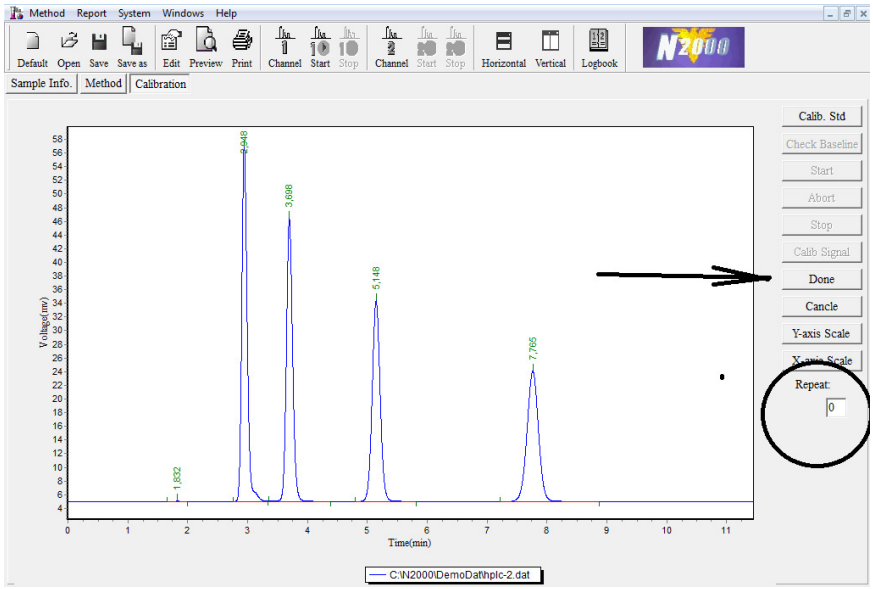
O botão “Calib Signal” estará habilitado.



Clique em “Calib Signal” para selecionar o arquivo de dados hplc-1.dat novamente e o número na caixa de repetições diminuirá para “1”.

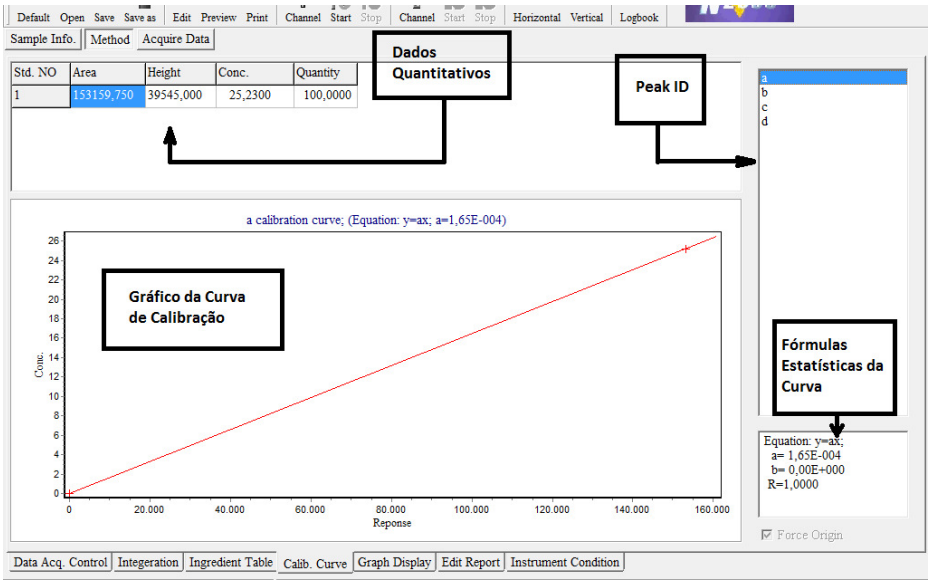


Repita o último procedimento, utilizando o arquivo de dados hplc-2.dat e o número na caixa de repetições cairá para “0” e o botão “Done” será habilitado.



Nota: Caso o botão “Done” não seja habilitado durante a calibração, será, provavelmente, devido ao fato de que o tempo de retenção de pelo menos um componente tenha caído fora da faixa de tempo inserida na tabela de componentes. Isto poderá ser corrigido modificando o tempo de retenção ou a faixa de tempo na tabela de componentes.

6. Clique em “Done” para apresentar uma nova janela para as curvas de calibração. Clique no respectivo Peak ID localizado na caixa que está no canto superior direito da janela para visualizar os dados quantitativos, as fórmulas da curva e o gráfico da curva de calibração.



Clique em "Save as" e nomeie o arquivo como "Calibração por Normalização.mtd", para salvar a curva de calibração para uso posterior.

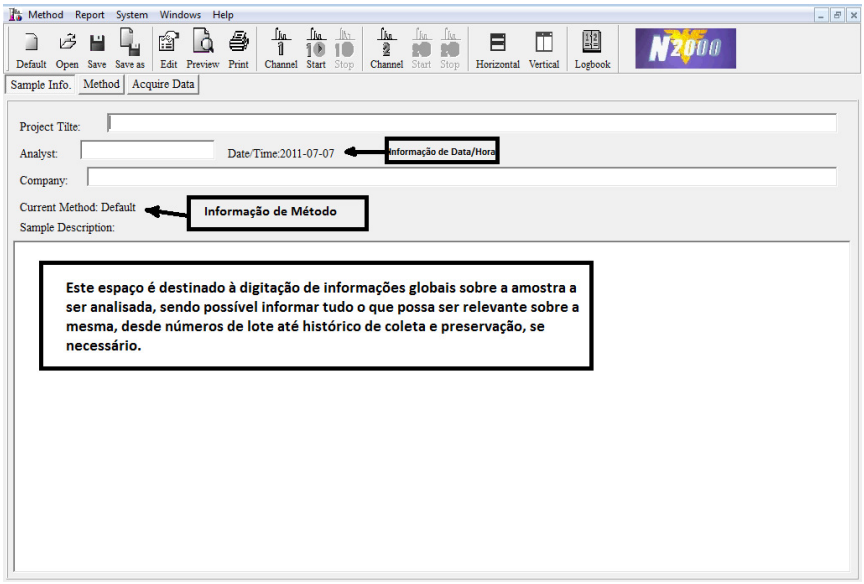
7. Injete a amostra

Proceda à injeção da amostra a ser analisada. Clique em "Stop" quando todos os picos tiverem eluído. Clique em "Preview" para visualizar os resultados.
Nota: quando um método de calibração por normalização é utilizado para a análise de amostras, não é necessário inserir a massa da amostra (os dados padrão são utilizados no lugar). Se o total não for 100% para a calibração normalizada baseada em área, um valor de proporcionalidade será digitado na caixa "Sample Weight". Por exemplo, se há 12% dos componentes que não são detectados (ou não são eluídos) o total dos componentes eluídos será de 88%. Neste caso, o parâmetro para a massa de amostra será inserido com o valor 88.

Capítulo 8: Gerenciando um Arquivo de Método (*.MTD)

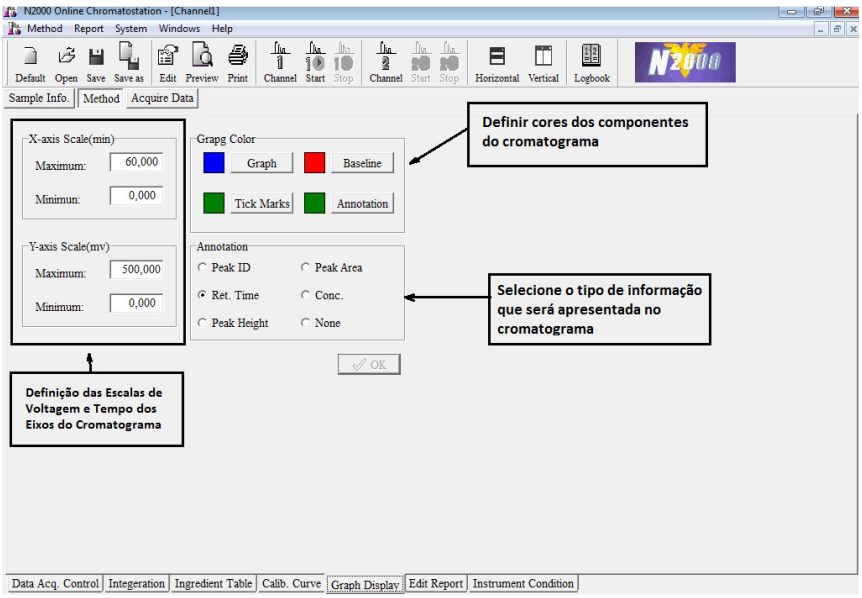
8.1. Inserindo Informações da Amostra

Como parte do relatório, a informação da amostra pode ser preenchida logo após a seleção do canal ou ao final da aquisição de dados. Clique na página "Sample Information" para apresentar uma página em branco. Digite as informações nas respectivas caixas. As informações de data, hora e método são geradas pelo sistema e não podem ser alteradas, sendo que as mesmas serão utilizadas na apresentação do relatório.


Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
Sample Info. Method Acquire Data
Project Tilte:
Analyst:
Date/Time:2011-07-07
Informação de Data/Hora
Company:
Current Method: Default
Sample Description:
Informação de Método
Este espaço é destinado à digitação de informações globais sobre a amostra a ser analisada, sendo possível informar tudo o que possa ser relevante sobre a mesma, desde números de lote até histórico de coleta e preservação, se necessário.

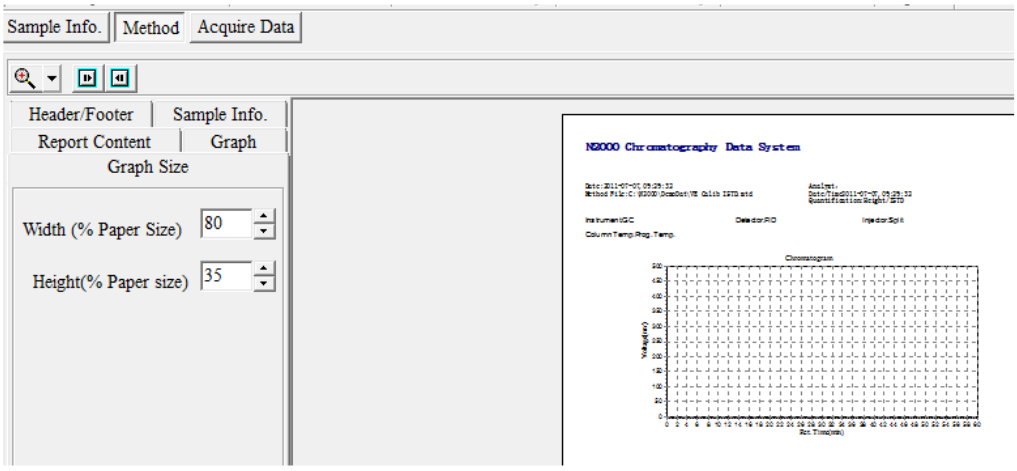
8.2. Selecionando Uma Apresentação do Cromatograma

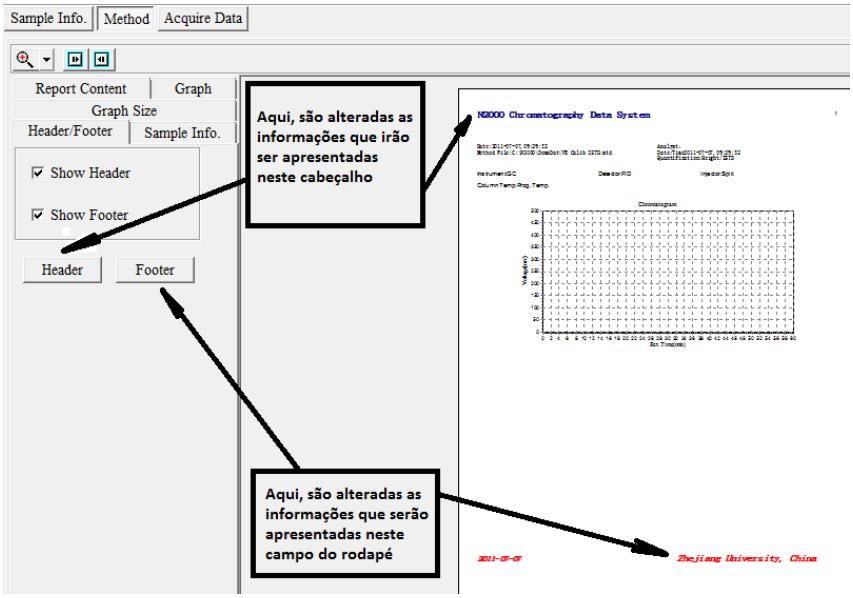
Vá até a página "Method" e clique em "Graph Display". Digite os valores para o eixo X (X-axis) e para o eixo Y (Y-Axis), ajustando suas escalas de tempo e voltagem para adequar ao seu cromatograma. Clique nas chaves adequadas para selecionar as cores que serão utilizadas para o cromatograma, linha de base, marcas de início e final de integração e anotações. Selecione a caixa apropriada para o tipo de anotação que será apresentada. Clique em "OK" para ativar as seleções.

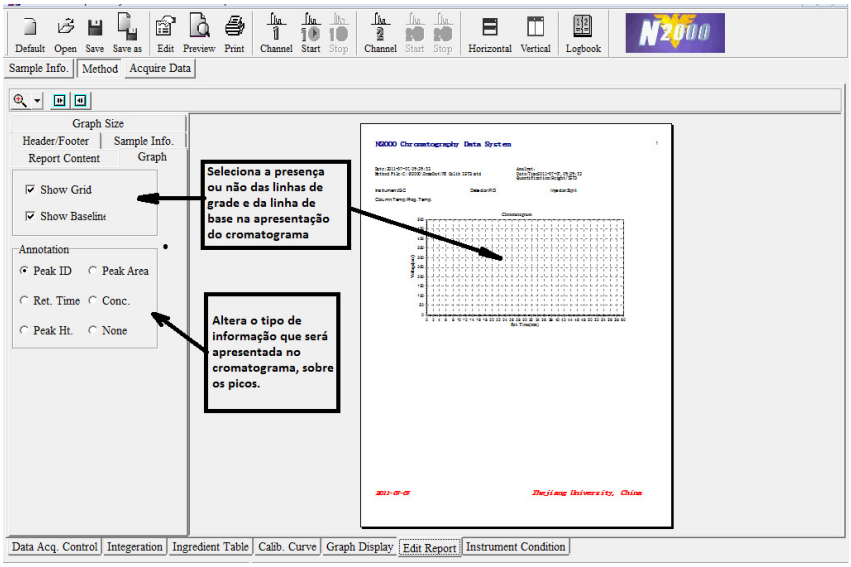

N2000 Online Chromatostation - [Channel1]
Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
Sample Info. Method Acquire Data
X-axis Scale(min)
Maximum: 60,000
Minimun: 0,000
Y-axis Scale(mv)
Maximum: 500,000
Minimum: 0,000
Grapg Color
Graph Baseline
Tick Marks Annotation
Annotation
Peak ID Peak Area
Ret. Time Conc.
Peak Height None
OK
Definir cores dos componentes do cromatograma
Selecione o tipo de informação que será apresentada no cromatograma
Definição das Escalas de Voltagem e Tempo dos Eixos do Cromatograma
Data Acq. Control Integeration Ingredient Table Calib. Curve Graph Display Edit Report Instrument Condition

8.3. Editando um Relatório

Vá até a página “Method” e clique em “Edit Report”. Clique em “Graph Size” para alterar o tamanho do cromatograma apresentado no relatório. Clique em “Header/Footer” para inserir as informações que serão apresentadas no cabeçalho e no rodapé do relatório. Clique em “Graph” para alterar a aparência do cromatograma.

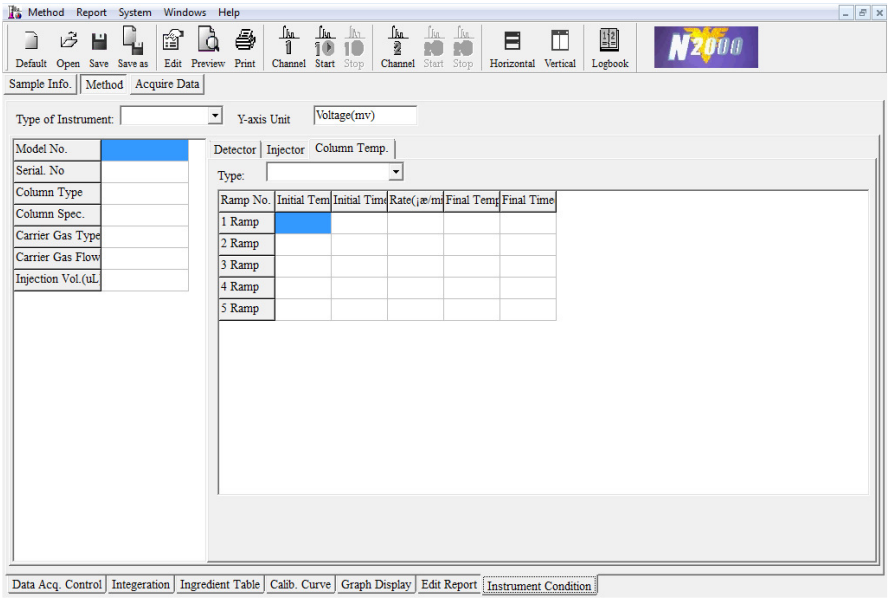



Sample Info.
Method
Acquire Data
Report Content
Graph
Graph Size
Header/Footer
Sample Info.
Show Header
Show Footer
Header
Footer
Aqui, são alteradas as informações que irão ser apresentadas neste cabeçalho
Aqui, são alteradas as informações que serão apresentadas neste campo do rodapé
N2000 Chromatography Data System
Zhejiang University, China


Default
Open
Save
Save as
Edit
Preview
Print
Channel
Start
Stop
Horizontal
Vertical
Logbook
N2000
Sample Info.
Method
Acquire Data
Graph Size
Header/Footer
Sample Info.
Report Content
Graph
Show Grid
Show Baseline
Annotation
Peak ID
Peak Area
Ret. Time
Conc.
Peak Ht.
None
Seleciona a presença ou não das linhas de grade e da linha de base na apresentação do cromatograma
Altera o tipo de informação que será apresentada no cromatograma, sobre os picos.
N2000 Chromatography Data System
Zhejiang University, China
Data Acq. Control
Integration
Ingredient Table
Calib. Curve
Graph Display
Edit Report
Instrument Condition

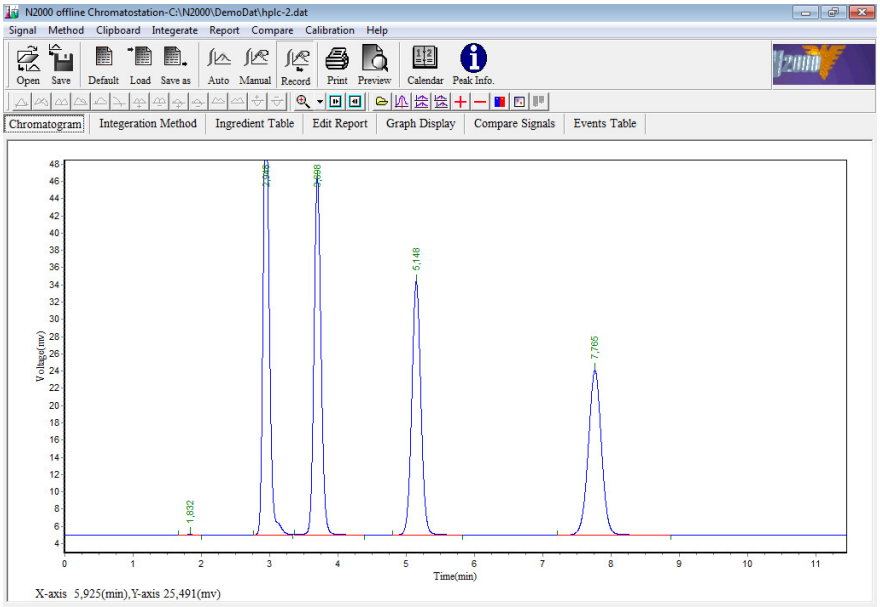
8.4. Inserindo as Condições do Instrumento

Vá até a página “Method” e clique em “Instrument Condition” para selecionar os parâmetros apropriados.


Method Report System Windows Help
Default Open Save Save as Edit Preview Print Channel Start Stop Channel Start Stop Horizontal Vertical Logbook
Sample Info. Method Acquire Data
Type of Instrument:
Y-axis Unit
Voltage(mv)
Model No.
Serial. No
Column Type
Column Spec.
Carrier Gas Type
Carrier Gas Flow
Injection Vol.(uL
Detector Injector Column Temp.
Type:
Ramp No. Initial Tem Initial Time Rate(°C/m Final Temp Final Time
1 Ramp
2 Ramp
3 Ramp
4 Ramp
5 Ramp
Data Acq. Control Integeration Ingredient Table Calib. Curve Graph Display Edit Report Instrument Condition

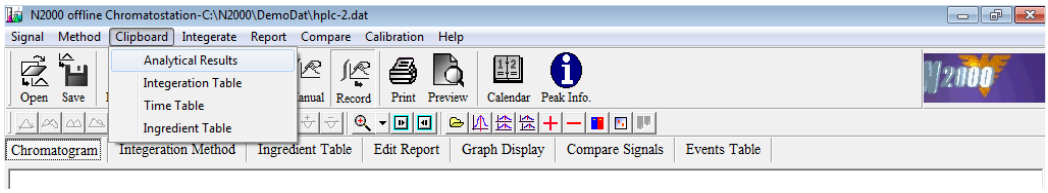
Capítulo 9: Processamento de Dados Pós-Aquisição – Estação de Trabalho OffLine

O sistemas de Dados Cromatográficos N2000 consiste em duas estações de trabalho, a OnLine e a OffLine. A Estação de Trabalho OffLine tem, essencialmente, as mesmas funções da versão OnLine, exceto a aquisição de dados em tempo real. Por outro lado, a Estação de Trabalho OffLine permite que você proceda a integrações manuais, comparação de cromatogramas, e exporte cromatogramas, tabelas de parâmetros de integração, tabelas de sequencias de tempo, tabelas de ingredientes, avaliação de sistema, para outros softwares para a adição de relatórios.


N2000 offline Chromatostation-C:\N2000\DemoDat\hplc-2.dat
Signal Method Clipboard Integerate Report Compare Calibration Help
Open Save Default Load Save as Auto Manual Record Print Preview Calendar Peak Info.
Chromatogram Integeration Method Ingredient Table Edit Report Graph Display Compare Signals Events Table
1,832
2,935
3,498
5,148
7,765
Voltage(mv)
Time(min)
X-axis 5,925(min),Y-axis 25,491(mv)

9.1. Customizando um Formato de Relatório

Uso do Clipboard e do compartilhamento de arquivos. Clique em "Clipboard" e selecione "Analytical Results" para exportar os resultados analíticos para qualquer lugar, através da função "Paste" ou "Colar" do Windows. Com esta função, você pode editar o relatório para ir de encontro às suas necessidades.


N2000 offline Chromatostation-C:\N2000\DemoDat\hplc-2.dat
Signal Method Clipboard Integerate Report Compare Calibration Help
Analytical Results
Integeration Table
Time Table
Ingredient Table
Open Save Record Print Preview Calendar Peak Info.
Chromatogram Integeration Method Ingredient Table Edit Report Graph Display Compare Signals Events Table

A edição de um relatório customizado envolve os seguintes passos:

9.1.1. Projete um relatório no MS-Word com detalhes como título, analista, data do experimento e método experimental.

CASEANALÍTICA
A excelência em instrumentação.

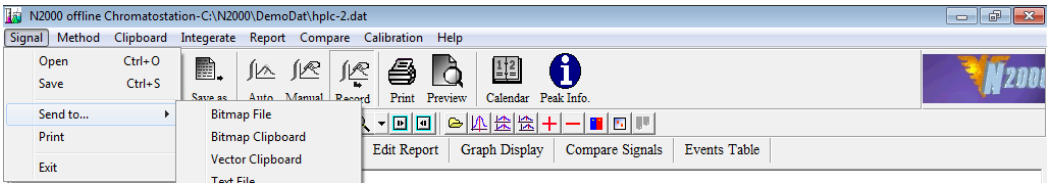
Case Analítica Comércio de Instrumentos Analíticos Ltda.
Av. Manoel Alves Soares, 39 – Sala 7 – Parque Colonial – Interlagos
São Paulo – SP – CEP: 04821-270
Fone/Fax: (11) 5662-1044 – 5662-8616

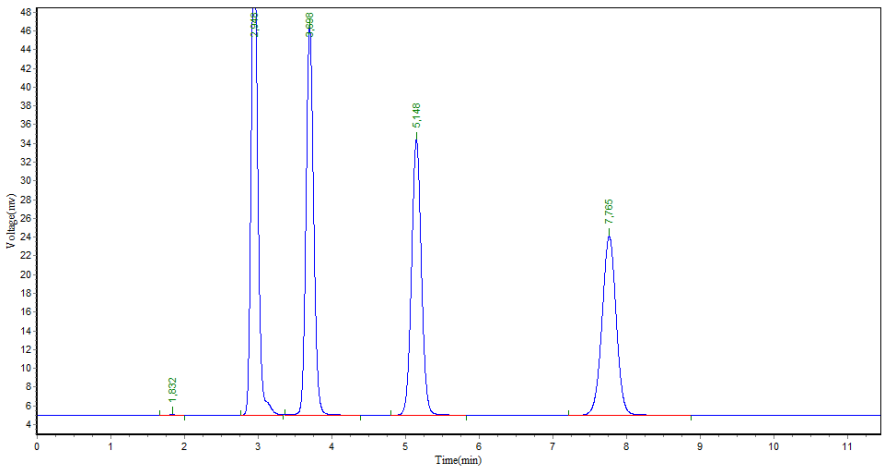
Análise de Formulação de Medicamento por HPLC

Analista: José da Silva
Data de Análise: 06/01/2011
Data do Relatório: 09/01/2011

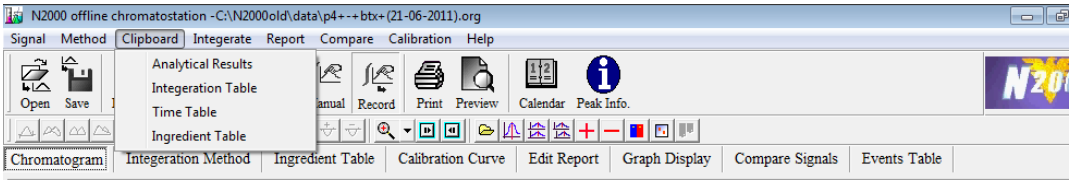
Instrumento: HPLC Unicom Optics LU230
Coluna: Abel C18 – 250 mm x 4,6 mm
Fase Móvel: MeOH:Água 80:20 (v/v)
Detector: UV – Comprimento de Onda: 254 nm
Temperatura da Coluna: Ambiente

9.1.2. Clique em “Signal” e vá para “Sent to”. Selecione entre “Bitmap Clipboard” ou “Vector Clipboard” para armazenar o cromatograma no clipboard. Clique em “Paste” ou “Colar” na página do Word para colar o cromatograma selecionado no relatório do Word.





9.1.3 Clique em “Clipboard” para selecionar “Analytical Results”, “Integration Table”, “Time Table” e “Integration Table” em sequência para exportá-los para o relatório no Word.



Resultados Analíticos

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		1,832	47,333	220,300	0,0000
2	a	2,948	39545,000	153159,750	25,2426
3		3,140	186,000	770,550	0,0000
4		3,473	73,800	412,372	0,0000
5	b	3,707	31128,400	223242,328	45,2426
6	c	5,157	22250,363	206554,500	15,5078
7	d	7,773	14462,000	193183,094	14,0070

Tabela de Integração

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
5	5,833	0,000	10,000	0,000	0,000	10,635	100,0000

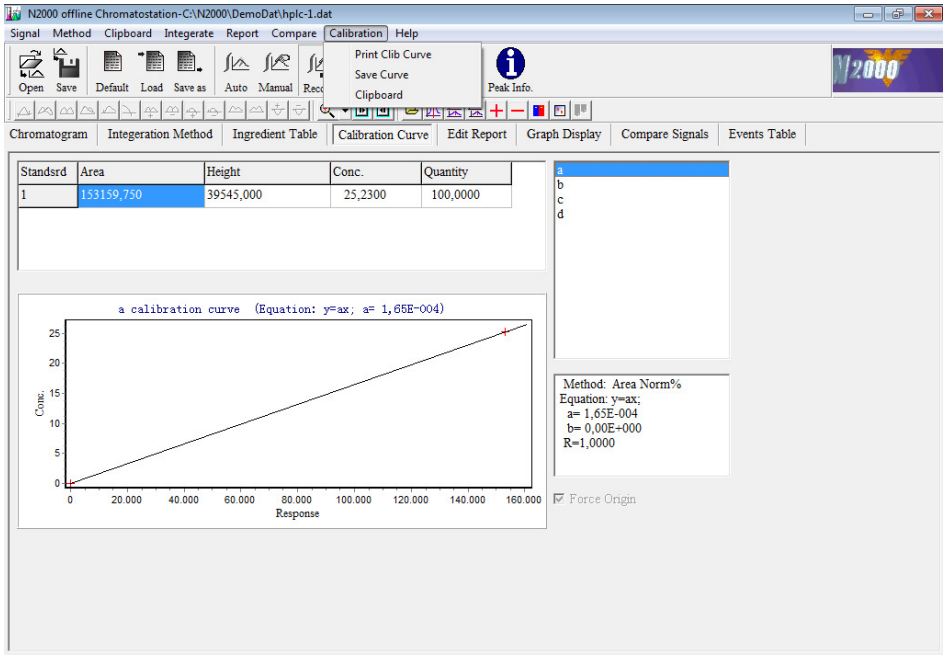
Tabela de Tempo

Start Tim	End Time	Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking	Retain	Tailing
2,000	30,000	5	0,001	0,000	1000,000	0,000	NO	YES	NO

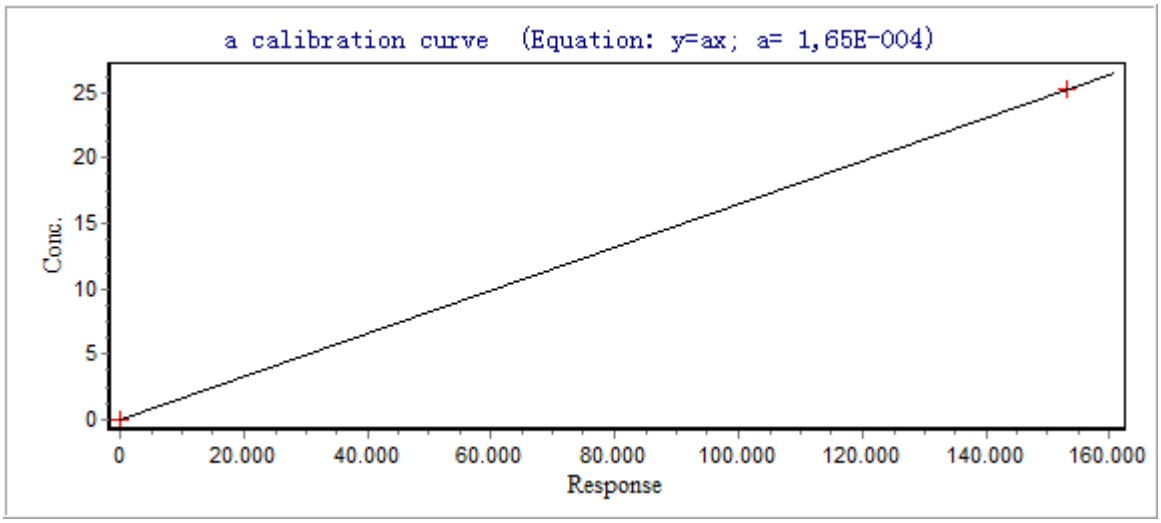
Tabela de Ingredientes

No	Peak ID	Ret Time	Peak Width	Factor 1	Factor 2	ISTD Wt.
1	a	2,948	0,183	0,0002	0,0000	0,0000
2	b	3,707	0,200	0,0002	0,0000	0,0000
3	c	5,157	0,350	0,0001	0,0000	0,0000
4	d	7,773	0,492	0,0001	0,0000	0,0000

9.1.4. Clique em “Calibration” no menu principal e selecione “Clipboard” para armazenar a curva de calibração exibida na tela no clipboard.



Clique em colar para acrescentar a curva de calibração ao relatório:



Um relatório completo customizado ficaria, então, como mostrado abaixo:

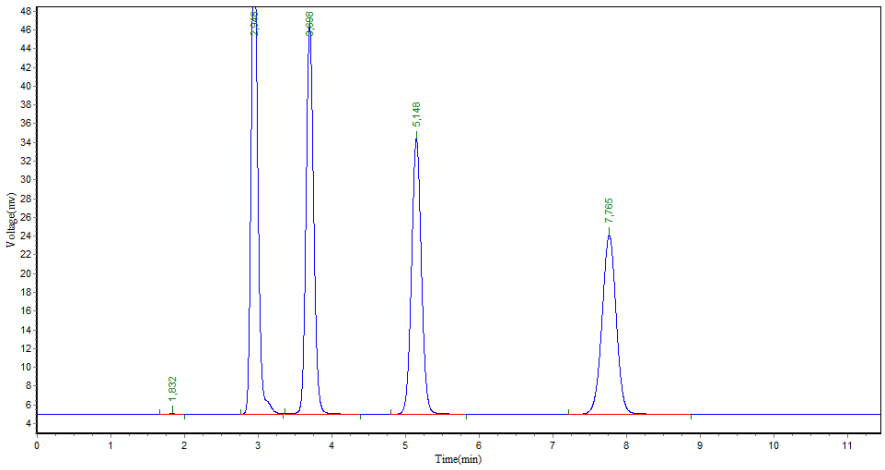
CASEANALÍTICA
A excelência em instrumentação.

Case Analítica Comércio de Instrumentos Analíticos Ltda.
Av. Manoel Alves Soares, 39 – Sala 7 – Parque Colonial – Interlagos
São Paulo – SP – CEP: 04821-270
Fone/Fax: (11) 5662-1044 – 5662-8616

Análise de Formulação de Medicamento por HPLC

Analista: José da Silva
Data de Análise: 06/01/2011
Data do Relatório: 09/01/2011

Instrumento: HPLC Unicom Optics LU230
Coluna: Abel C18 – 250 mm x 4,6 mm
Fase Móvel: MeOH:Água 80:20 (v/v)
Detector: UV – Comprimento de Onda: 254 nm
Temperatura da Coluna: Ambiente



Resultados Analíticos

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		1,832	47,333	220,300	0,0000
2	a	2,948	39545,000	153159,750	25,2426
3		3,140	186,000	770,550	0,0000
4		3,473	73,800	412,372	0,0000
5	b	3,707	31128,400	223242,328	45,2426
6	c	5,157	22250,363	206554,500	15,5078
7	d	7,773	14462,000	193183,094	14,0070

Tabela de Integração

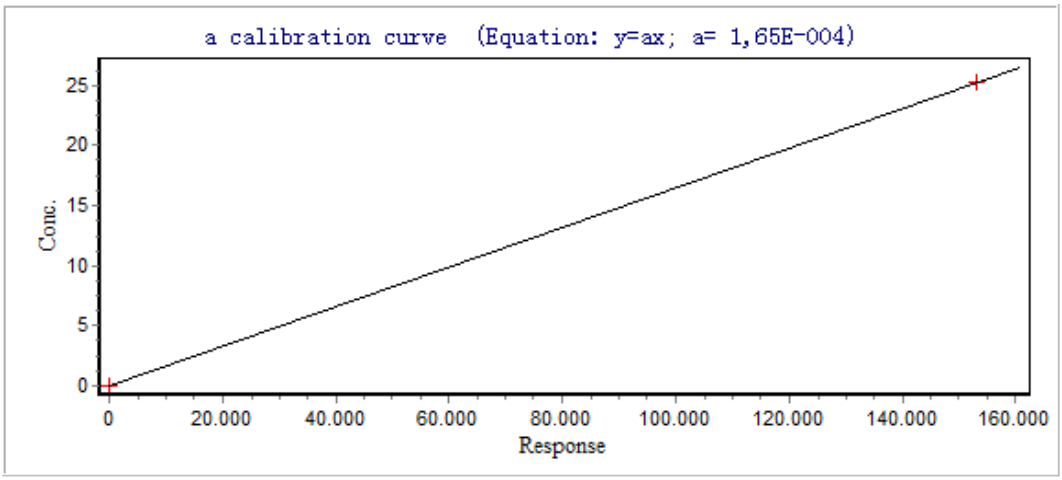
Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
5	5,833	0,000	10,000	0,000	0,000	10,635	100,0000

Tabela de Tempo

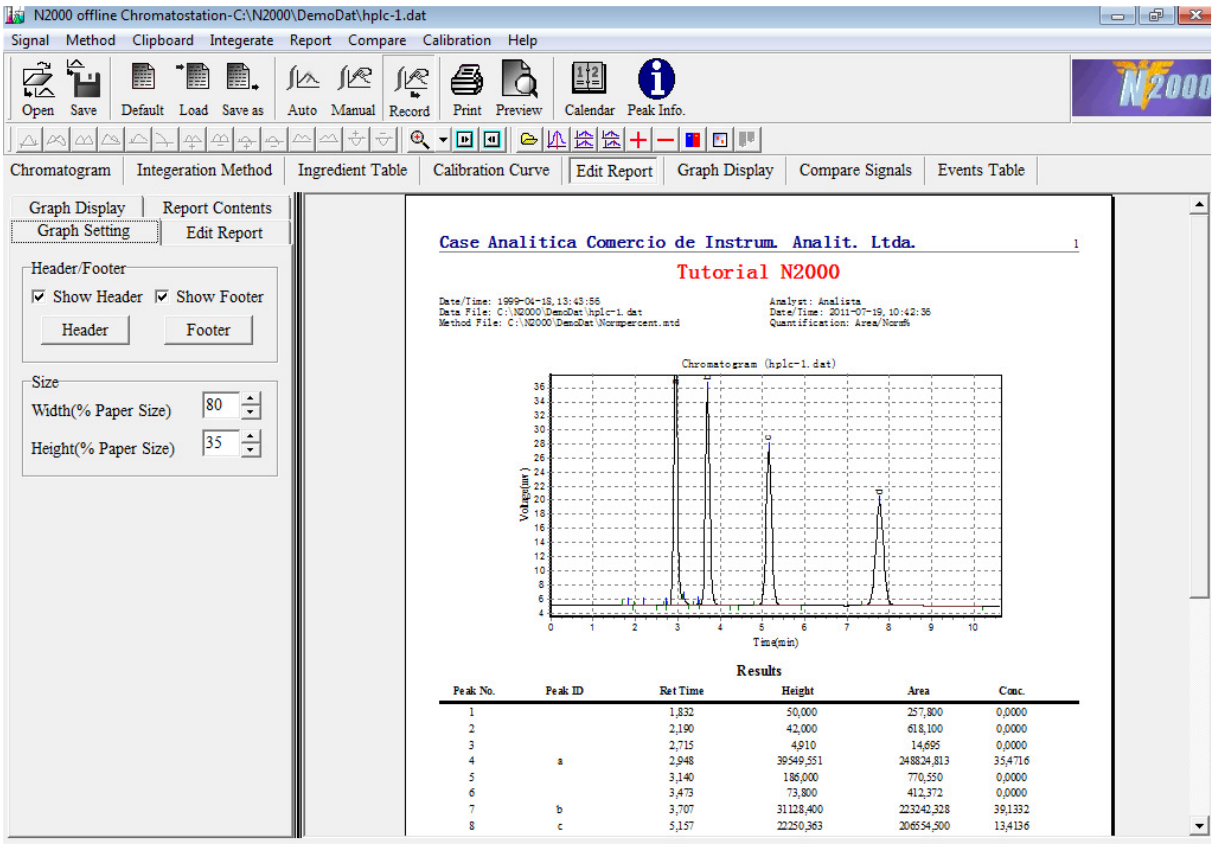
Start Time	End Time	Width	Slope	Drift	Min Area	Time Param	Locking	Retain Tailing
2,000	30,000	5	0,001	0,000	1000,000	0,000	NO	YES	NO

Tabela de Ingredientes

No	Peak ID	Ret Time	Peak Width	Factor 1	Factor 2	ISTD Wt.
1	a	2,948	0,183	0,0002	0,0000	0,0000
2	b	3,707	0,200	0,0002	0,0000	0,0000
3	c	5,157	0,350	0,0001	0,0000	0,0000
4	d	7,773	0,492	0,0001	0,0000	0,0000



Assim, podemos comparar o relatório customizado com o gerado pela Estação de Trabalho:

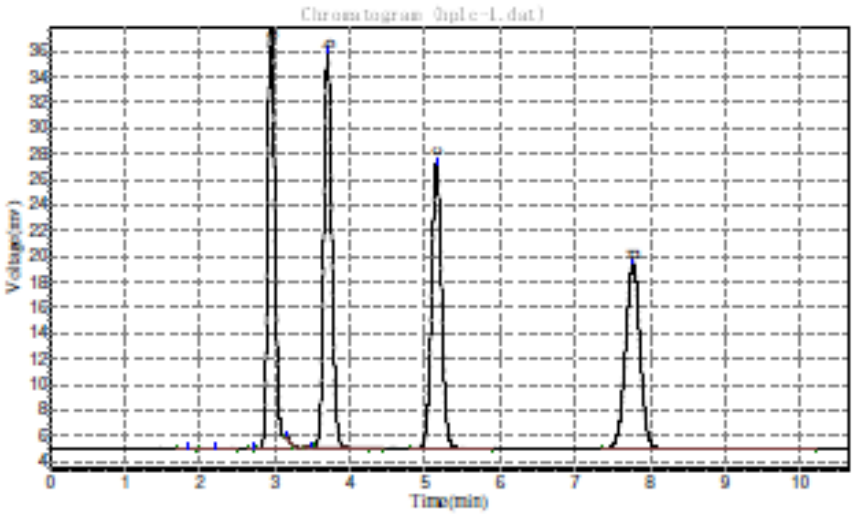

N2000 offline Chromatostation-C:\N2000\DemoDat\hplc-1.dat
Signal Method Clipboard Integerate Report Compare Calibration Help
Open Save Default Load Save as Auto Manual Record Print Preview Calendar Peak Info.
Chromatogram Integeration Method Ingredient Table Calibration Curve Edit Report Graph Display Compare Signals Events Table
Graph Display Report Contents
Graph Setting Edit Report
Header/Footer
Show Header Show Footer
Header Footer
Size
Width(% Paper Size) 80
Height(% Paper Size) 35
Case Analitica Comercio de Instrum. Analit. Ltda.
Tutorial N2000
Chromatogram (hplc-1.dat)
Voltage(uv)
Time(min)
Results
Peak No. Peak ID Ret Time Height Area Conc.
1 1,832 50,000 257,800 0,0000
2 2,190 42,000 618,100 0,0000
3 2,715 4,910 14,695 0,0000
4 a 2,948 39549,551 248824,813 35,4716
5 3,140 186,000 770,550 0,0000
6 3,473 73,800 412,372 0,0000
7 b 3,707 31128,400 223242,328 39,1332
8 c 5,157 22250,363 206554,500 13,4136

Case Analitica Comercio de Instrum. Analit. Ltda. 1

Tutorial N2000

Date/Time: 1999-04-18 13:43:56
Data File: C:\N2000\Demodat\hplc-1.dat
Method File: C:\N2000\Demodat\Normpercent.mtd

Analyst: Analista
Date/Time: 2011-07-19 10:44:10
Quantification: Area%Norm%



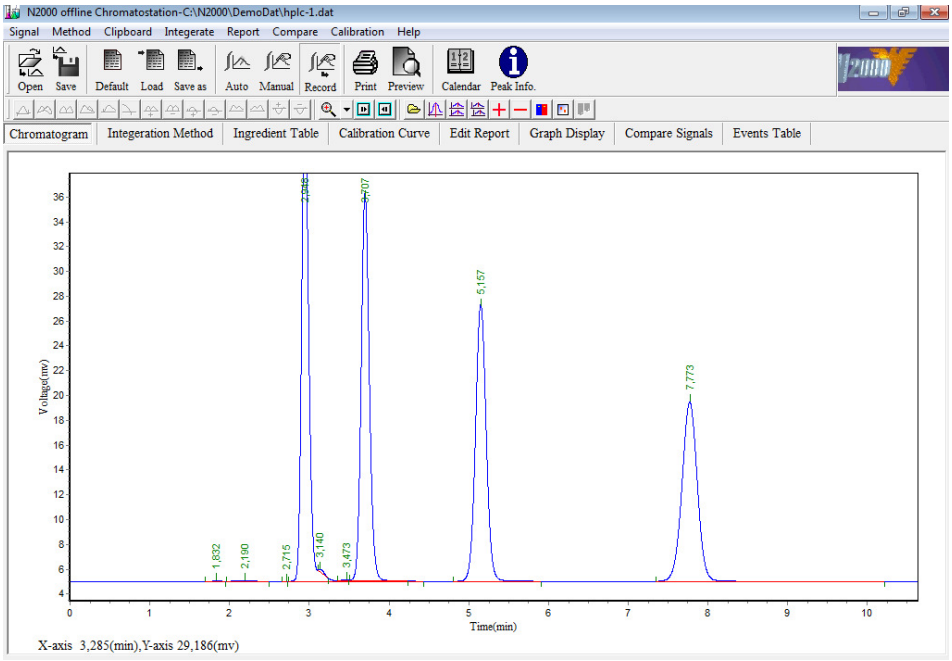
Results

Peak No.	Peak ID	Ret Time	Height	Area	Conc.
1		1,832	50,000	257,800	0,0000
2		2,190	42,000	618,100	0,0000
3		2,715	4,910	14,695	0,0000
4	a	2,948	39549,551	248824,813	35,4716
5		3,140	186,000	770,550	0,0000
6		3,473	73,800	412,372	0,0000
7	b	3,707	31128,400	223242,328	39,1332
8	c	5,157	22250,363	206554,500	13,4136
9	d	7,773	14456,000	191046,406	11,9815
Total			107741,025	871741,563	100,0000

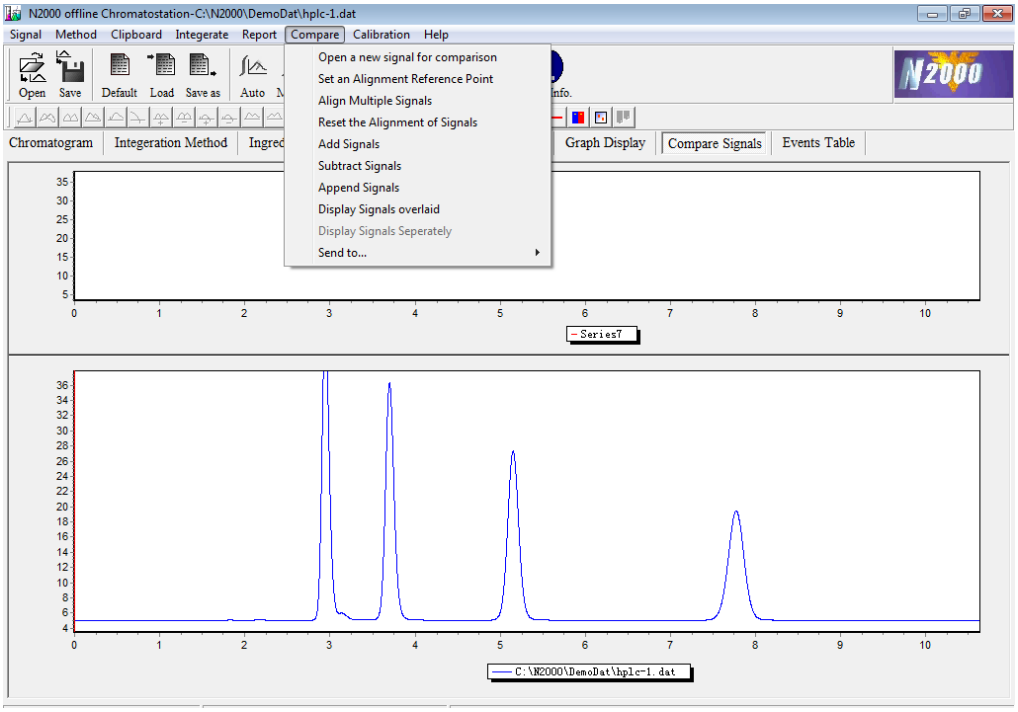
2011-07-19 *Case Analitica*

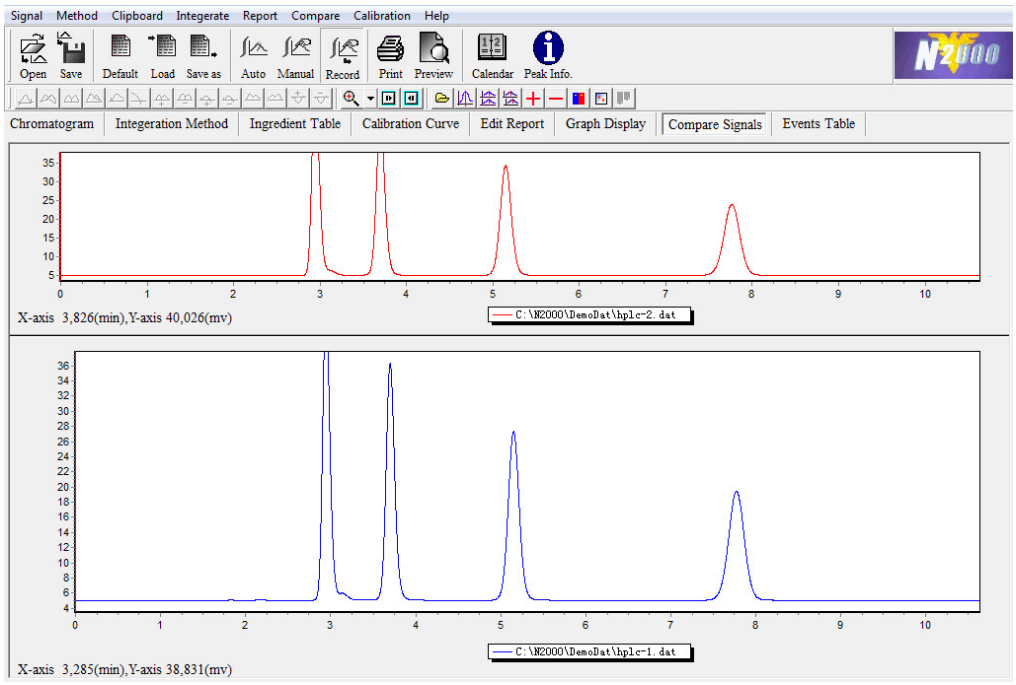
9.2. Compare Cromatogramas

Clique em “Chromatogram” para abrir um arquivo de cromatograma.

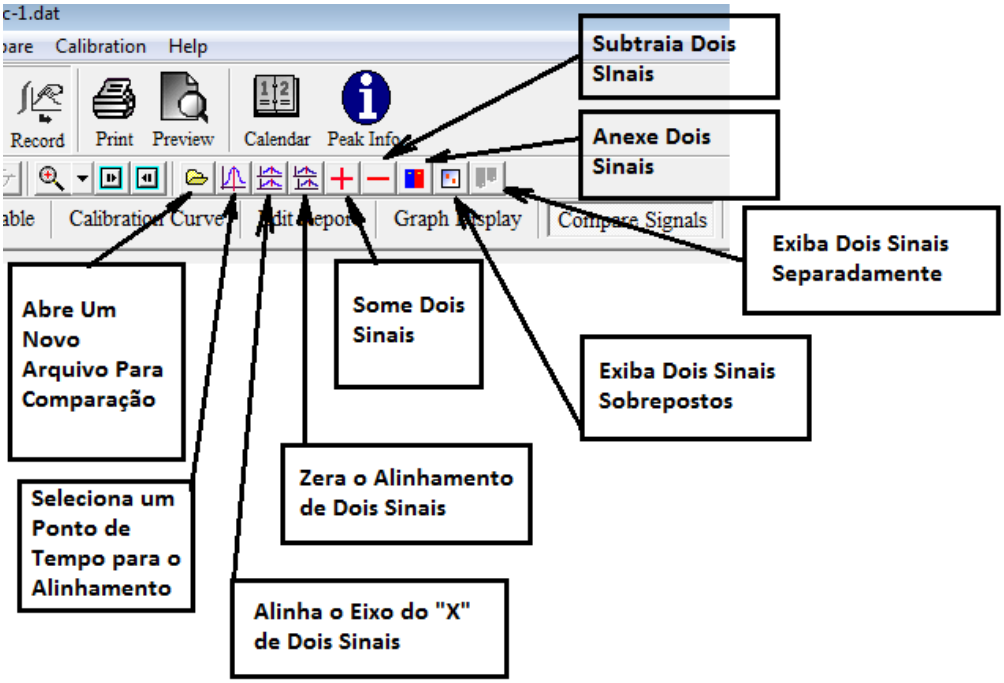


Clique em “Compare Signals” para abrir uma nova janela e, então, vá para “Compare” no menu principal e selecione “Open a new signal for comparison” para carregar um novo arquivo de cromatograma.

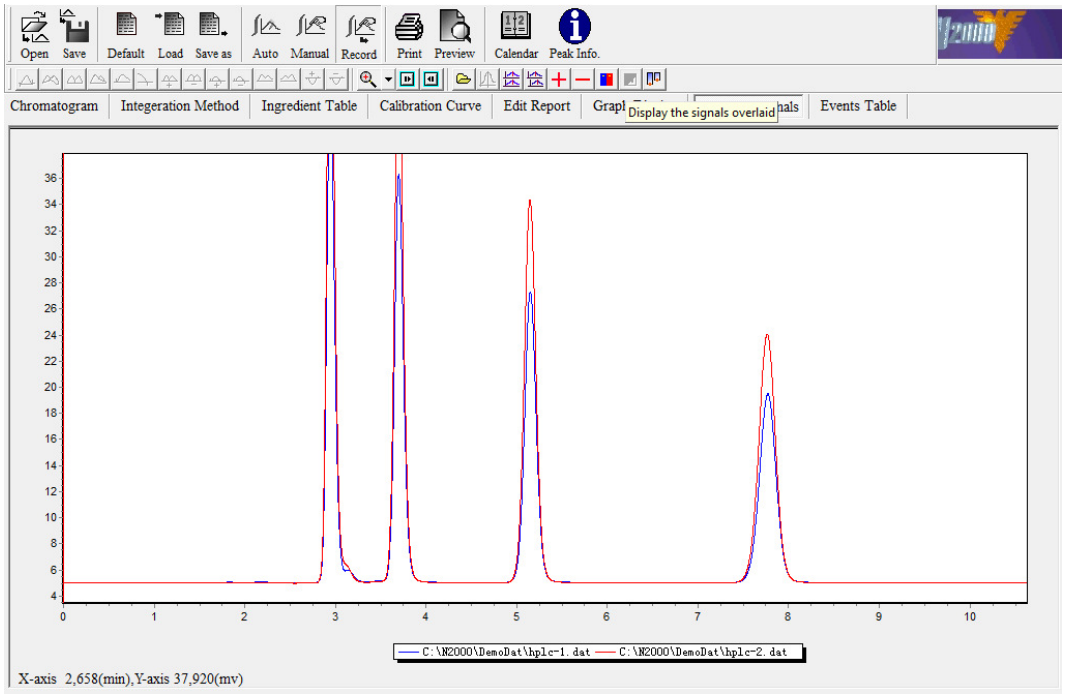



Signal Method Clipboard Integerate Report Compare Calibration Help
Open Save Default Load Save as Auto Manual Record Print Preview Calendar Peak Info.
Chromatogram Integeration Method Ingredient Table Calibration Curve Edit Report Graph Display Compare Signals Events Table
X-axis 3,826(min),Y-axis 40,026(mv)
C:\N2000\DemoDat\hplc-2.dat
C:\N2000\DemoDat\hplc-1.dat
X-axis 3,285(min),Y-axis 38,831(mv)

9.2.1. Compare múltiplos cromatogramas em uma janela simples ou múltipla.



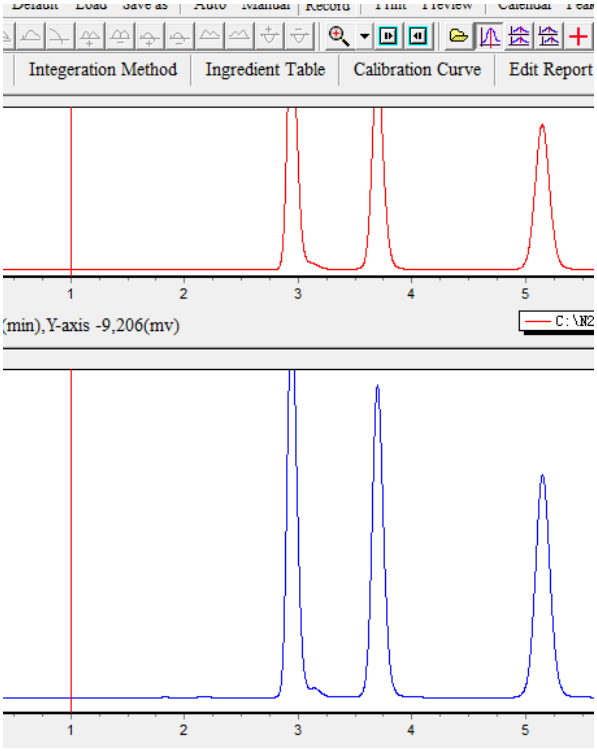
Por padrão, a estação de trabalho exibe dois sinais separadamente. De modo que, clicando no botão “Display Signals Overlaid” (Exibir sinais sobrepostos), teremos a exibição dos dois sinais em uma única janela.



Você pode abrir mais cromatogramas para comparação, selecionando “Open a new signal for comparison” no menu principal.

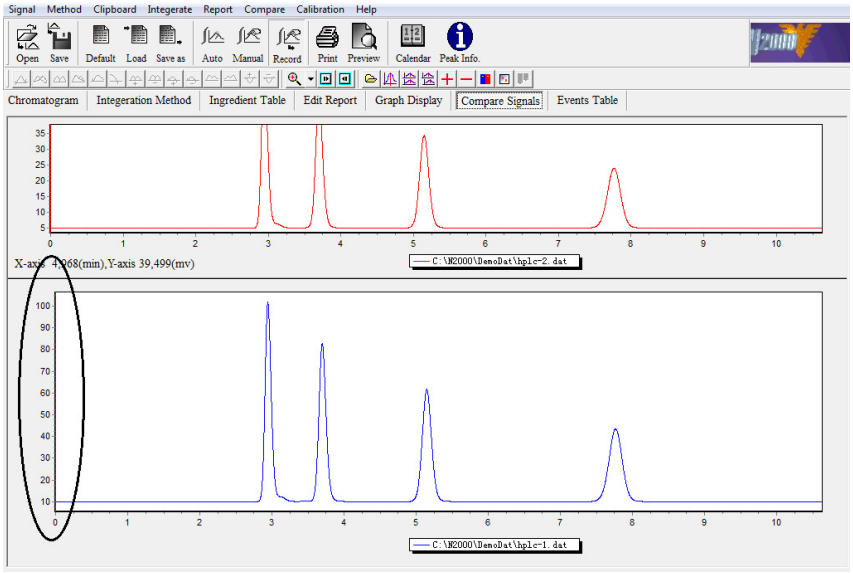
9.2.2. Alinhamento de Cromatogramas

Você pode alinhar dois sinais para facilitar a comparação. Por padrão, a estação de trabalho alinha os sinais de acordo com o ponto de partida. Porém, você pode alinhar os sinais escolhendo um tempo predeterminado (clique em "set a time point to alignment") e, então clique em "Align two signals".

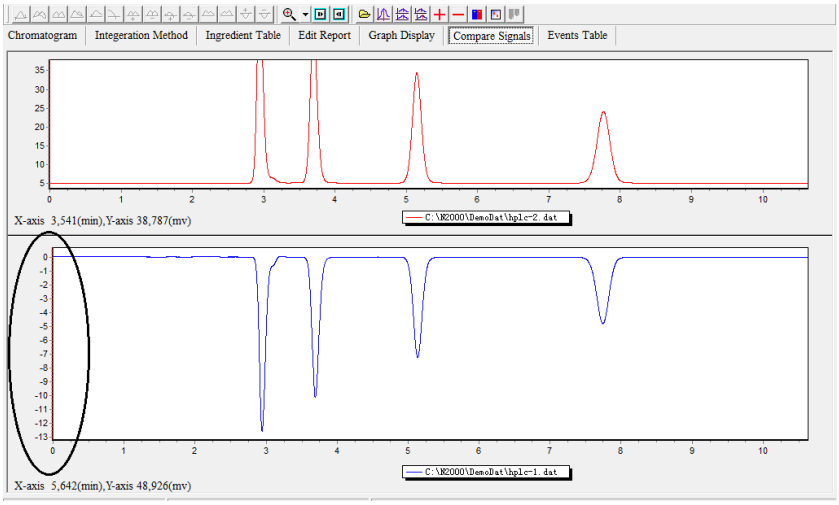


9.2.3. Some ou Subtraia Cromatogramas

Clique em "Add Signals" para somar dois sinais.

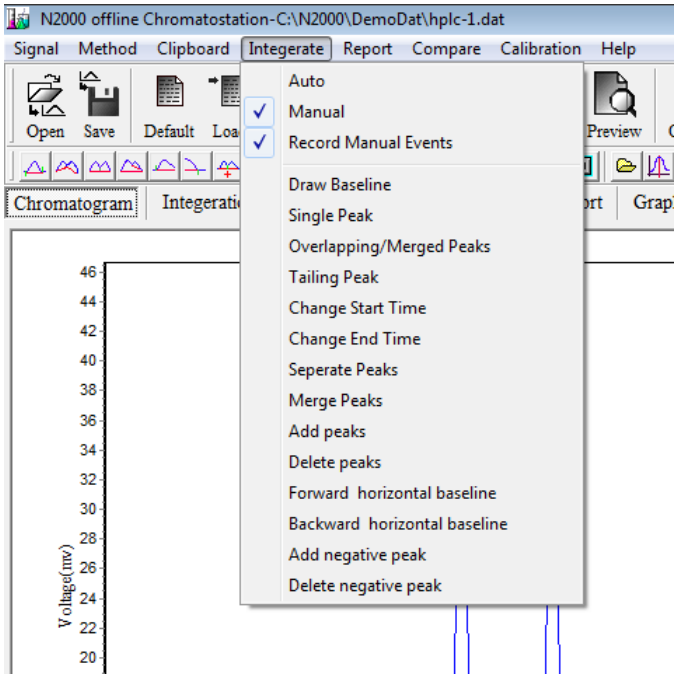

Signal Method Clipboard Integerate Report Compare Calibration Help
Open Save Default Load Save as Auto Manual Record Print Preview Calendar Peak Info.
Chromatogram Integeration Method Ingredient Table Edit Report Graph Display Compare Signals Events Table
C:\N2000\DemoDat\hplc-2.dat
C:\N2000\DemoDat\hplc-1.dat

Ou clique em “Substract Signals” para subtraí-los

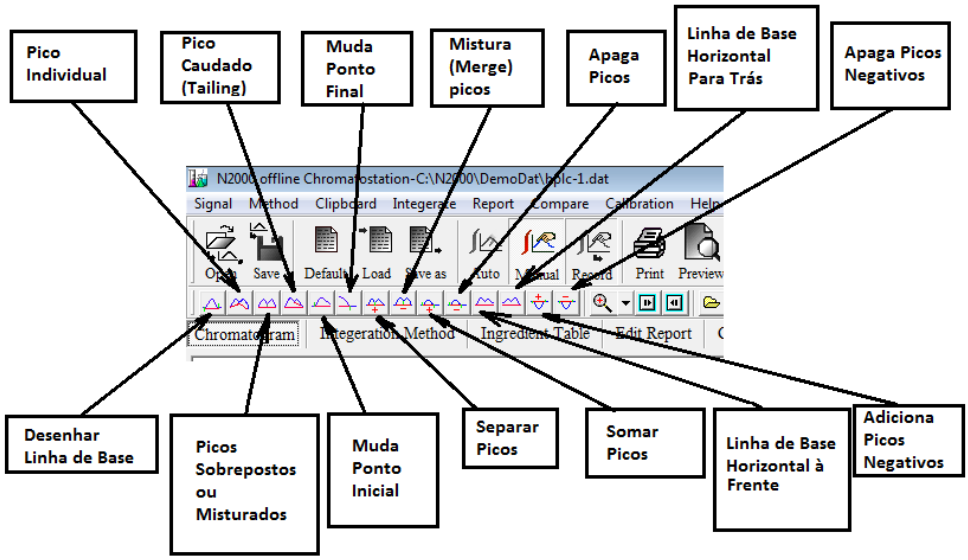

Chromatogram Integeration Method Ingredient Table Edit Report Graph Display Compare Signals Events Table
X-axis 3,541(min),Y-axis 38,787(mv)
C:\N2000\DemoDat\hplc-2.dat
C:\N2000\DemoDat\hplc-1.dat
X-axis 5,642(min),Y-axis 48,926(mv)

9.3. Integração Manual

Vá para “Integration” no menu principal e selecione “Manual” para abrir o menu de funções de integração manual e habilitar os respectivos botões na barra de tarefas.



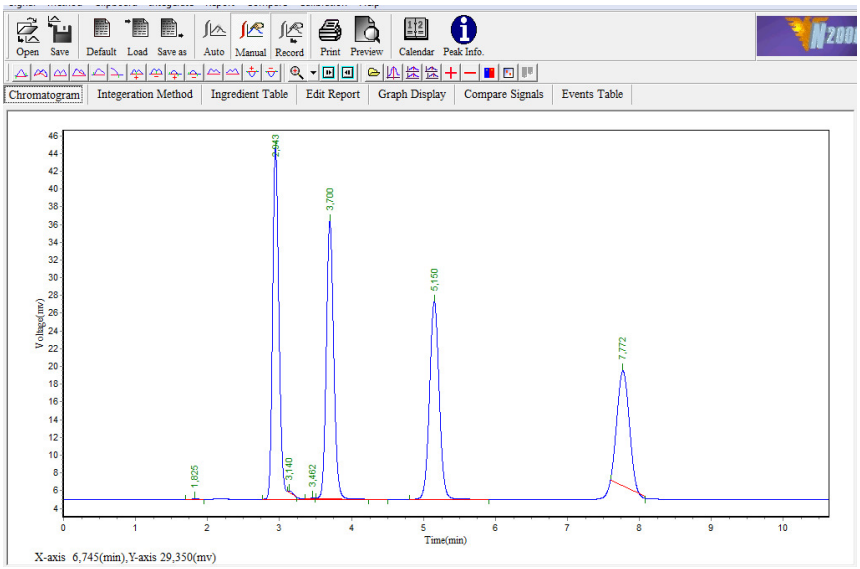
Ou, simplesmente, clique no botão “Manual” na barra de ferramentas para habilitar diretamente os botões de integração manual da mesma.



9.3.1. Desenhar Linha de Base

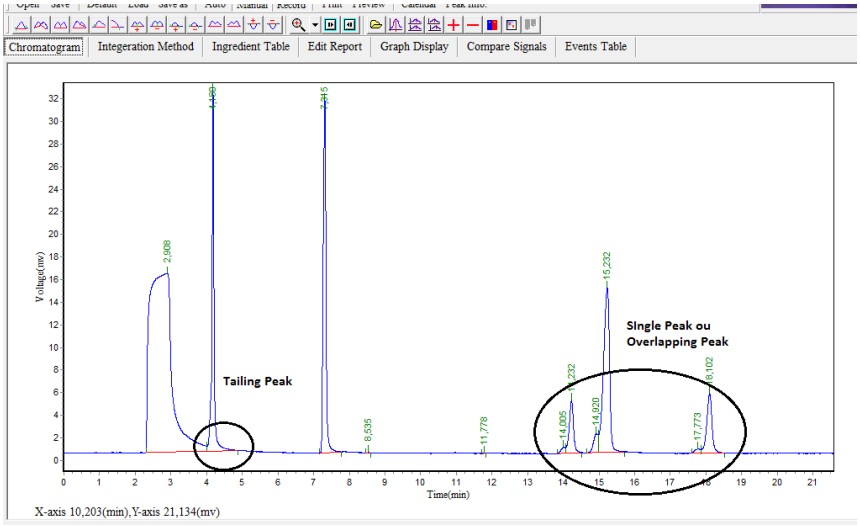
Clique no botão “Draw Baseline” ou selecione a função através do menu e, então, posicione o cursor no ponto inicial de integração desejado, clicando, a seguir, com o botão esquerdo do mouse. Posicione o cursor no ponto final de integração desejado e clique, novamente, o

botão esquerdo do mouse para desenhar uma nova linha de base entre o ponto de início e o ponto final. A área do pico será calculara a partir desta nova linha de base.



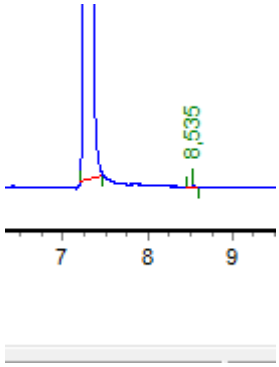
9.3.2. Mudando Tipos de Picos

Clique em “Single Peak” ou Overlapping Peak” ou em “Tailing Peak” ou selecione uma destas funções no menu e, então, posicione o cursor no ponto de início de integração, clicando, em seguida, o botão esquerdo do mouse. Posicione o cursor no ponto de final de integração e clique novamente o botão esquerdo do mouse, para desenhar uma nova linha de base entre os dois pontos selecionados. A área do pico será calculada a partir desta nova linha de base.



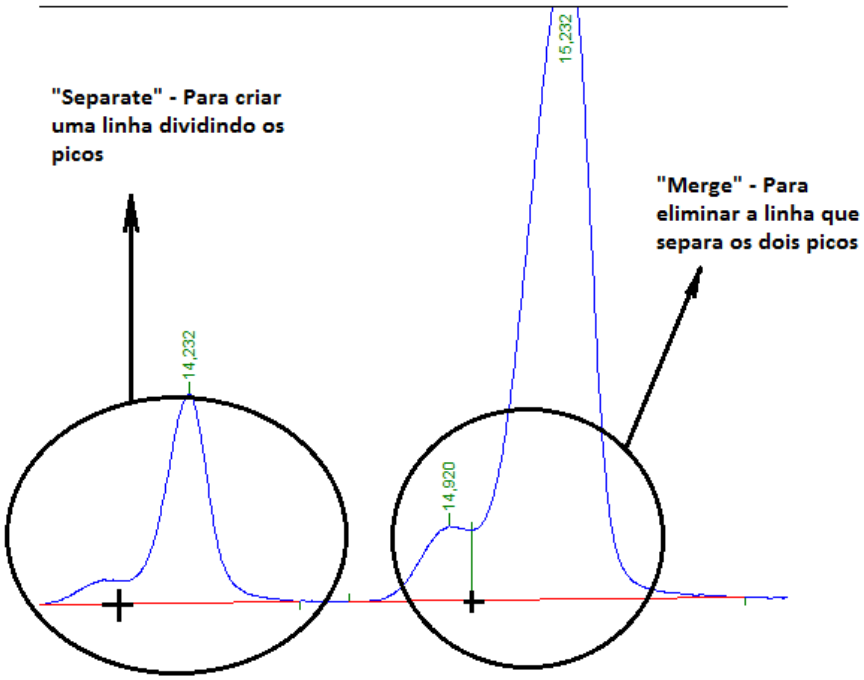
9.3.3. Mude o tempo de início ou final

Clique em “Change Start Time” ou “Change End Time” ou selecione uma destas funções no menu e posicione o cursor no pico a ser modificado e clique com o botão esquerdo do mouse. Posicione o cursor no ponto inicial de integração ou no ponto final de integração desejados e clique com o botão esquerdo do mouse para desenhar uma nova linha de base.



9.3.4. Separe ou Misture Picos

Clique em “Separate Peaks” ou Merge Peaks” ou selecione uma das funções no menu. Depois posicione o cursor no local onde os picos deverão ser separados ou mesclados e clique com o botão esquerdo do mouse para inserir ou eliminar uma linha de separação entre dois picos.

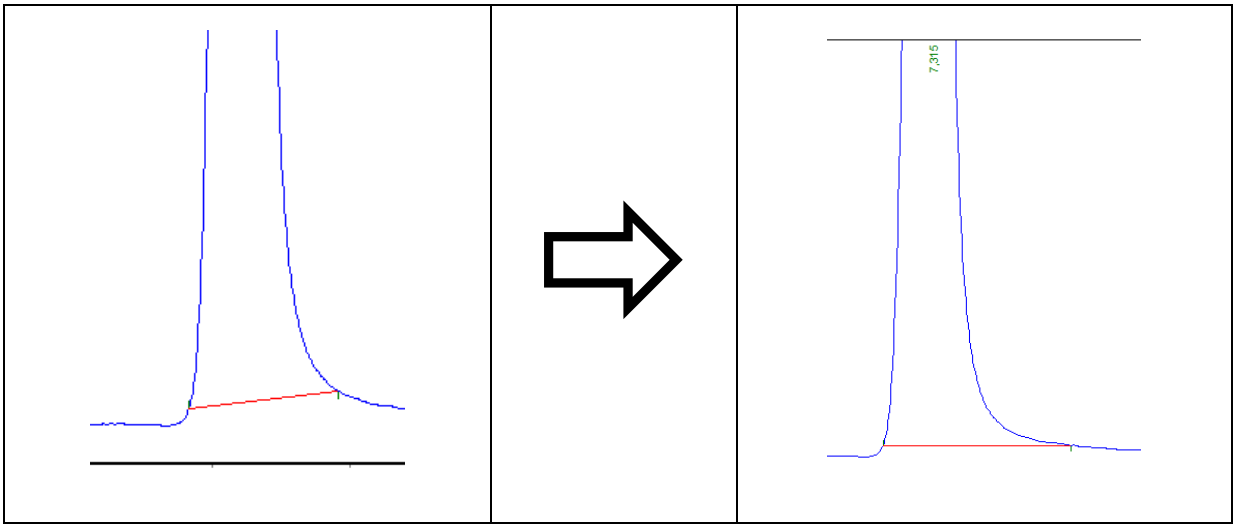


9.3.5. Adicionar ou Apagar um Pico

Clique em “Add Peaks” ou “Delete Peaks”, ou selecione uma destas funções no menu e, então, posicione o cursor no ponto inicial de integração do pico a ser modificado, clicando, então, com o botão direito do mouse. Posicione o cursor no ponto final de integração do pico a ser modificado e clique, novamente, no botão esquerdo do mouse, para desenhar uma nova linha de base para o pico a ser adicionado ou deletar a linha de base do pico a ser apagado.

9.3.6. Linha de Base Horizontal à Frente ou Atrás

Clique em “Forward Horizontal Baseline” ou em “Backward Horizontal Baseline”, ou selecione uma destas funções no menu. Posicione o cursor no ponto de partida do pico a ser modificado e clique o botão esquerdo do mouse. Posicione o cursor no ponto final do pico a ser modificado e clique novamente o botão esquerdo do mouse para desenhar uma nova linha de base horizontal.

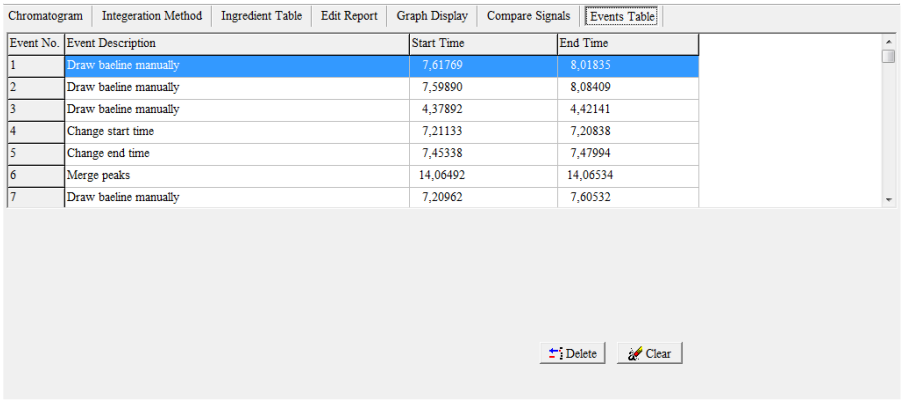


9.3.7. Adicionar ou Deletar Picos Negativos

Clique em “Add Negative Peak” ou em “Delete Negative Peak” ou selecione uma das duas funções no menu. Posicione o cursor no ponto de início de integração do pico a ser modificado e clique no botão esquerdo do mouse. Então, posicione o cursor no ponto final de integração do pico e clique novamente no botão esquerdo do mouse para adicionar ou apagar um pico negativo.

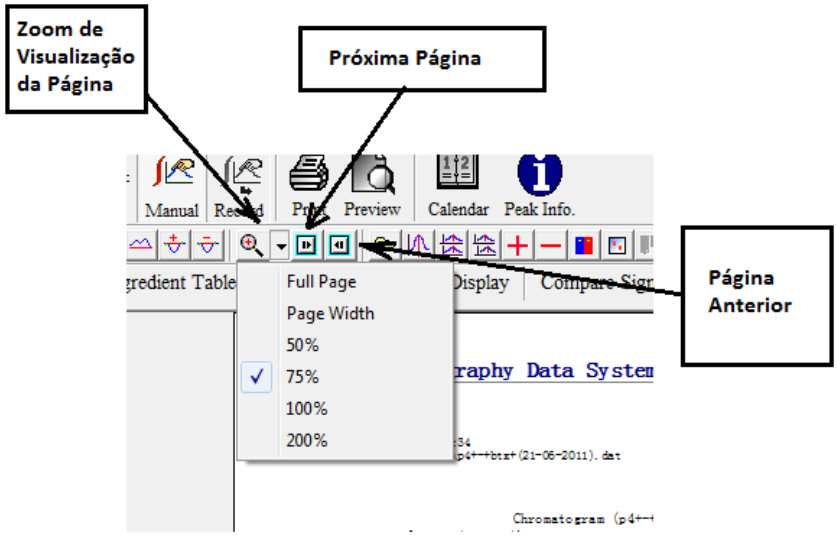
9.4. Tabela de Integração Manual

Todas as operações envolvendo integração são gravadas na “Tabela de Eventos”. A partir desta tabela, você pode rastrear as mudanças realizadas desde o início até o final da corrida. Você pode apagar seletivamente ou completamente as entradas através do ícone “Delete”.



9.5. Exibição

Clique em “Zoom In Report Rewiew” para modificar o tamanho da página a ser exibida. Clique em “Next Page” (setas para a direita) ou “Previous Page” (setas para a esquerda) para ver as páginas desejadas.



9.6. Exibição de Informação Sobre Um Pico Individualmente

Selecione um pico em um cromatograma e clique no botão “Peak Info” na barra de tarefas para visualizar detalhes sobre o pico